

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS NEUROBIOLÓGIA PROGRAM

**A GONADÁLIS SZTEROIDOK ÉS AZ IMMUNOLÓGIAI KIHÍVÁS
HATÁSA AZ ERK1/2 FOSZFORILÁCIÓRA AZ EGÉR
KÖZPONTI IDEGRENSZERÉBEN *IN VIVO***

Doktori (Ph.D.) értekezés

Barabás Klaudia

A Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Programvezető: Dr. Sass Miklós

Témavezetők: Dr. Juhász Gábor, az MTA doktora

Dr. Ábrahám István, tudományos főmunkatárs

MTA-ELTE Neurobiológiai Kutatócsoport

BUDAPEST

2008

TARTALOMJEGYZÉK

ÁBRÁK JEGYZÉKE.....	6
TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	7
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	8
1. ELŐSZÓ.....	9
2. BEVEZETÉS	10
2.1. A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli útvonala.....	11
2.1.1. Az extracelluláris szignál-regulált kináz1/2 (ERK1/2) jelátviteli útvonala	12
2.1.2. Az ERK1/2 útvonala szerepe a biológiai folyamatokban	13
2.2. Az ösztrogén hatásmechanizmusa	14
2.2.1. Klasszikus hatások.....	15
2.2.2. Nem-klasszikus hatások	16
2.2.3. Az ösztrogén gyors, nem-klasszikus hatásai az ERK jelátviteli útvonalon keresztül.....	18
2.3. Az ösztrogén hatások nemi dimorfizmusa	19
2.4. A hypothalamus-hypophysis-gonád tengely	20
2.5. A GnRH neuronok ösztrogén általi szabályozásának lehetséges módjai.....	22
2.6. A humorális immunválasz folyamatának rövid áttekintése.....	23
2.6.1. T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz.....	23
2.6.2. T-sejt-független antigénre adott humorális immunválasz	24
2.7. Neuro-immun interakciók: kétirányú kapcsolat az idegrendszer és az immunrendszer között	25
2.7.1. Az idegrendszer kommunikációja az immunrendszerrel.....	25
2.7.2. Az immunrendszer kommunikációja az idegrendszerrel.....	26
2.7.3. A citokinek és a prosztaglandinok szerepe.....	27
2.7.4. A hypothalamus-hypophysis-gonád tengely és az immunrendszer közötti kölcsönhatások	29
2.8. Az ösztrogén szerepe az immunfolyamatokban	31
2.9. A MAPK-ok szerepe az idegrendszeri gyulladásos folyamatokban és a neuroprotekción	32
2.10. A gonadális szteroidok és az immunológiai kihívás interakciójának hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára	33

3. CÉLKITŰZÉSEK	34
4. ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	35
4.1. Kísérleti állatok	35
4.I. A gonadális szteroidok hatása az ERK1/2 foszforilációra	35
4.I.1. A kísérleti állatok kezelése I.	35
4.I.1.1. Gonadektómia	35
4.I.1.2. 1 órás 17- β -ösztadiol kezelés.....	35
4.I.1.3. Folyamatos 17- β -ösztadiol és progeszteron kezelés.....	35
4.I.1.4. Folyamatos 17- β -ösztadiol kezelés.....	36
4.I.2. Transzkardiális perfúzió.....	37
4.I.3. Szövettani módszerek I.	37
4.I.3.1. Metszés és szövettárolás	37
4.I.4. Kvantitatív immunhisztokémia	38
4.I.4.1. Peroxidázzal jelölt ERK és pERK1/2 immuncitokémia	38
4.I.4.2. Kvantitatív képelemzés	39
4.I.5. Egy-sejt szintű vizsgálatok.....	39
4.I.5.1. Fluoreszcens immuncitokémia	39
4.I.5.1.1. ERK és GnRH kettős immuncitokémiai festés	39
4.I.5.1.2. pERK1/2 és GnRH kettős immuncitokémiai festés	40
4.I.5.1.3. Kvantitatív képelemzés	40
4.I.6. Hormonmérés	40
4.I.6.1. Luteinizáló hormon (LH) RIA	40
4.I.6.2. 17- β -ösztadiol RIA	41
4.II. Az immunológiai kihívás hatása az ERK1/2 foszforilációra.....	41
4.II.1. A kísérleti állatok kezelése II.....	41
4.II.1.1. KLH-FITC oltás.....	41
4.II.1.2. CFA oltás	41
4.II.1.3. Dextrán-FITC oltás	41
4.II.1.4. Indomethacin kezelés.....	41
4.II.2. Szövettani módszerek II.....	42
4.II.3. Western blot.....	42
4.II.4. Limfocita izolálás	43
4.II.5. Az agyból izolált sejtek citofluorimetriás mérése.....	43

4.II.6. Citokin ELISA	44
4.III. A gonadális szteroidok és az immunstressz interakciójának hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára.....	44
4.III.1. A kísérleti állatok kezelése III.....	44
4.III.1.1. Gonadektómia és KLH-FITC oltás.....	44
4.III.1.2. 17- β -ösztadiol kezelés és KLH-FITC oltás.....	45
4.III.2. Ösztroz ciklus és LH szint meghatározás	46
4.III.3. Szövettani módszerek III.....	46
4.2. Ellenanyagszint és ellenanyagtermelő plazmasejt szám mérés.....	46
4.2.1. ELISA	46
4.3. Statisztikai módszerek.....	47
5. EREDMÉNYEK.....	48
5.I. A gonadális szteroidok hatása az ERK1/2 foszforilációra	48
5.I.1. Az ERK1/2 foszforiláció kvalitatív és kvantitatív meghatározása.....	48
5.I.1.1. A gonadektómia hatása az ERK1/2 foszforilációra nőstény és hím egerekben.....	50
5.I.1.2. Az ösztrogén hatása az ERK1/2 foszforilációra gonadektomizált nőstény és hím egerekben	51
5.I.2. Egy-sejt szintű vizsgálatok.....	54
5.I.2.1. A gonadektómia és a gonadális szteroidok hatása az ERK1/2 foszforilációra a GnRH neuronokban.....	55
5.II. Az immunológiai kihívás hatása az ERK1/2 foszforilációra.....	57
5.II.1. A T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz hatása az ERK1/2 foszforilációra a GnRH neuronokban.....	57
5.II.2. A T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz hatása az ERK1/2 foszforilációra az egér agy különböző előagy és köztiagy területén.....	59
5.II.3. Az immunkihívás GnRH neuronokban indukált ERK1/2 foszforilációjának lehetséges mechanizmusa	60
5.II.3.1. Az antigén szerepének vizsgálata	60
5.II.3.2. A T-sejtek szerepének vizsgálata.....	61
5.II.3.3. A citokinek szerepének vizsgálata	62
5.II.3.4. A prosztaglandinok szerepének vizsgálata	62
5.II.4. Az immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforiláció szerepe a hypothalamus-hypophysis-gonád (HPG) tengely szabályozásában.....	63

5.III. A gonadális szteroidok és az immunológiai kihívás interakciójának hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára	64
6. MEGVITATÁS.....	67
6.I. A gonadális szteroidok hatása az ERK foszforilációra	67
6.I.1. A szexuálisan dimorf ösztrogén-indukált ERK1/2 foszforiláció lehetséges mechanizmusa és fiziológiás következményei az AVPV-ben és a mPOA-ban	67
6.I.2. A gonadektómia szexuálisan dimorf hatása a Pir-ben	70
6.I.3. Az ERK1/2 lehetséges szerepe az ösztrogén CREB foszforilációra kifejtett szexuálisan dimorf hatásában és módszertani következtetések	71
6.I.4. Az ERK1/2 foszforiláció gonadális szteroid érzékenysége és az ERK1/2 útvonal lehetséges szerepe a GnRH neuronokban.....	72
6.II. Az immunológiai kihívás hatása az ERK1/2 foszforilációra.....	73
6.II.1. Az immunológiai kihívás ERK1/2 foszforilációt okoz a GnRH idegsejtekben	73
6.II.2. Az immunológiai kihívás ERK1/2 foszforilációt kiváltó hatásának lehetséges mechanizmusa	74
6.II.3. Az immunológiai kihívás által okozott ERK1/2 foszforiláció lehetséges szerepe	77
6.III. A gonadális szteroidok és az immunológiai kihívás interakciójának hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára	79
6.III.1. Az ösztrogén szerepe az immunkihívás által kiváltott ERK1/2 foszforilációban	79
7. KIEGÉSZÍTŐ ÁBRÁK	81
8. ÖSSZEFOGLALÓ	83
9. SUMMARY.....	84
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	85
11. IRODALOMJEGYZÉK	86

ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra. Az ERK1/2 jelátviteli kaszkád
2. ábra. A hypothalamus-hypophysis-gonád tengely szabályozási sémája
3. ábra. A HPG tengely és az immunrendszer kölcsönhatása
4. ábra. A kísérleti állatok kezelésének folyamatábrája I.
5. ábra. A kísérleti állatok kezelésének folyamatábrája II.
6. ábra. A pERK1/2 és az ERK lokalizációja a sejtekben
7. ábra. A gonadektómia hatása az ERK1/2 foszforilációra nőstény és hím egerek agyában
8. ábra. Az ösztrogén hatása az ERK1/2 foszforilációra nőstény és hím egerek agyában
9. ábra. A pERK1/2 és az ERK lokalizációja a GnRH neuronokban
10. ábra. A gonadektómia hatása az ERK foszforilációra nőstény egerek GnRH neuronjában
11. ábra. A gonadális szteroidok hatása az ERK1/2 foszforilációra nőstény egerek GnRH neuronjában
12. ábra. Az ERK1/2 foszforiláció időbeli változása a GnRH neuronokban KLH-FITC-cel történő immunizálás után
13. ábra. A FITC ellen termelt ellenanyagok szintje a vérsérumban KLH-FITC oltás után 6 nappal
14. ábra. A CFA hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára
15. ábra. A KLH-FITC hatása ERK1/2 foszforilációra az agyban
16. ábra. A dextrán-FITC hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára
17. ábra. A FITC ellen termelt ellenanyagok szintje a sérumban dextrán-FITC oltás után
18. ábra. A CD3⁺ T-sejtek százalékos aránya az agyban
19. ábra. Proinflammatorikus citokinek mennyisége az agyban KLH-FITC-indukált perifériás gyulladást követően
20. ábra. Az Indomethacin hatása a KLH-FITC által GnRH neuronokban indukált ERK1/2 foszforilációra
21. ábra. A luteinizáló hormon (LH) szintje a plazmában

- 22. ábra. A gonadektómia hatása immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforilációra
- 23. ábra. A FITC ellen termelt ellenanyagok szintje a szérumban gonadektómia hatására
- 24. ábra. Az ösztrogén szerepe az immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforilációban
- 25. ábra. A FITC ellen termelt ellenanyagok szintje a szérumban ösztrogén hatására
- 26. ábra. Hematoxylin-eosin festés a KLH-FITC-cel kezelt és kontroll egerekben
- 27. ábra. Mikroglia festés kontroll és KLH-FITC-cel kezelt egerekben
- 28. ábra. A GnRH neuron és a mikroglia szoros kontaktusa

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

- 1. táblázat. Az ERK és a pERK1/2 fehérje eloszlása egér agyban
- 2. táblázat. A kvalitatív térképezés alapján a pERK1/2 fehérje szintjében nemi különbséget mutató agyi területek
- 3. táblázat. A gonadektómia és az ösztrogén hatásának összefoglalása az ERK expressziójára a vizsgált agyterületeken

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AH	anterior hypothalamus	MS	medialis septum
AVPV	anteroventralis periventricularis mag	OD	optikai denzitás
BNST	bed nucleus striae terminalis	OVLT	organum vasculosum laminae terminalis
BSA	borjú szérum albumin	P	progeszteron
cAMP	ciklikus adenosin monofoszfát	pERK	foszforilált extracelluláris szignál-regulált kináz
CFA	komplett Freund adjuváns	PG	prostaglandin
Cg	cingularis cortex	PGE₂	prostaglandin E ₂
CREB	cAMP-függő DNS válasz elemet kötő fehérje	Pir	piriformis cortex
COX	ciklooxigenáz	PVN	paraventricularis mag
E₂	17- β -ösztradiol	SHAM	álműtét
ER	ösztrogén receptor	SEM	standard hiba
ERα	α típusú ösztrogén receptor	Tc	citotoxikus T-sejt
ERβ	β típusú ösztrogén receptor	Th	segítő T-sejt
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz	TNF	tumor nekrozis faktor
FITC	6-(fluoreszcein-5-(és-6)-karboxamid -hexánsav, szukcinimidyl észter	V	vivóanyag
FSH	follikulus stimuláló hormon		
GABA	gamma-amino-vajsav		
GDX	petefészekirtás		
GnRH	gonadotrop releasing hormon		
HPG	hypothalamus-hypophysis-gonád		
I	immunizálás		
Ig	immunglobulin		
IL	interleukin		
KLH	hemocyanin („keyhole limpet”-ből)		
LH	luteinizáló hormon		
M(1-2)	motoros cortex		
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz		
MHC	fő hisztokompatibilitási génkomplex		
mPOA	medialis preopticus area		

1. ELŐSZÓ

A doktori értekezésem célkitűzése, azoknak a vizsgálatoknak a bemutatása, melyek az ERK1/2 jelátviteli útvonal működését tanulmányozzák egér agyban *in vivo*. A kísérletek, melyeket ebben a témában végeztem alapkutatás jellegűek és a neuroendokrinológia, illetve a neuro-immuno-endokrinológia tárgykörébe tartoznak. Az írás során törekedtem az idegen szakkifejezések magyar megfelelőinek használatára. Az anatómiai nevek és hatóanyagok esetében azonban latin nevezéktant alkalmaztam, ugyanakkor a könnyebb érthetőség kedvéért az irodalomban megszokott angol rövidítéseket (pl. HPG, ER) használtam.

2. BEVEZETÉS

Az evolúció során bonyolult jelfogó rendszer alakult ki a sejtek környezetéből érkező információk feldolgozására, mely lehetővé teszi a környezet változásaira adott megfelelő válaszütemet, végső soron a sejt életben maradását. A jelfogó rendszer egyszerű formában már a prokariótákban és az egysejtű eukariótákban is megtalálható, de különös jelentőségre és fejlettségre a többsejtű szervezetekben tett szert, ahol a szervezetet alkotó sejtek működésének összehangolása a fő feladata. A jelfogó rendszer sejtfelszíni receptorokból és a receptorokat a sejtmag, vagyis a géntranszkripció és más biokémiai mechanizmusok felé átszóló szignálrendszerből áll. A receptorokon keresztül hosszan tartó molekuláris áthangolódások jöhetnek létre, melyek átalakíthatják az adott organizmus alapvető életfolyamatait, megváltoztathatják a sejtek életképességét stb. Ezeknek a változásoknak a létrejöttében alapvető szerepet játszanak a jelátviteli útvonalak, melyek olyan hálózatot alkotnak, melyben - a mai tudásunk szerint - a jelre adott választ az aktivált szignálmolekulák minősége és térbeli elhelyezkedése szabja meg. Ugyanakkor mivel a szignálútvonalak száma a receptorok számához képest kevés, egy jelátviteli útvonal több biológiai funkciót is befolyásol.

Mivel az emlős szervezetet két nagy rendszer, az immun- és az idegrendszer szabályozza, fontos, hogy feltárjuk kölcsönhatásaik törvényszerűségeit, hormonális szabályozásuk folyamatait, ami által a betegségek molekuláris mechanizmusait is jobban megérthetjük. Munkám során a gonadális szteroidok és az immunológiai kihívás hatására kialakuló sejtszintű szignálváltozásokat és az immunrendszert moduláló hormonális hatásokban szerepet játszó szignáltranszdukciós folyamatokat vizsgáltam.

Ezeknek a folyamatoknak a tanulmányozásához az összetett jelfogó rendszer elemei közül a mitogén-aktivált protein kináz 1/2 (MAPK1/2) vagy másnéven az extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2 (ERK1/2) jelátviteli útvonalat választottuk ki; a doktori értekezésem ennek az útvonalnak a működését veszi górcső alá a központi idegrendszerben. Vizsgálatainkat egyes hypothalamicus és előagyai területeken, valamint a reprodukciót szabályozó gonadotrop releasing hormon (GnRH) neuronon végeztük.

Kísérleteink első részében az **ERK1/2** szignálkaskád **gonadális hormon függését**, valamint **nemek közti különbségeit** határoztuk meg a fent említett területeken normális, fiziológiás körülmények között. Annak megállapítására, hogy a gonadális szteroidok (ösztrogén, progeszteron) hogyan módosítják az ERK1/2 jelátviteli útvonal működését, két fő kísérleti rendszert alkalmaztunk. Egyrészt műtéti beavatkozás (petefészkek eltávolítás)

segítségével inverz módon, a hormonok hiányának hatásából következtettünk a petefészek hormonjainak ERK1/2 jelátviteli kaszkád szabályozásában betöltött szerepére, másrészt a gonadális hormonok pontos szerepét hormon visszapótlással állapítottuk meg.

Kísérleteink második részében normális működésektől eltérő körülmények között tanulmányoztuk az ERK1/2 jelátviteli út vonal működését, immunológiai kihívás (humorális immunválasz kiváltása) után vizsgáltuk az ERK1/2 út vonalat.

Végül, kísérleteink utolsó részében a **gonadális hormonok és az immunológiai kihívás** ERK1/2 szignálút vonalon érvényesülő **interakcióját** próbáltuk feltárni a GnRH idegsejtekben, az előző két kísérleti rendszerben alkalmazott kísérleti technikák kombinálásával.

Kísérleteink fő célja tehát az ösztrogén- és az immunstimulus-indukálta jelátviteli változások, valamint ezek kölcsönhatásának vizsgálata volt az agyban, ami számos betegség nemi eloszlásának és a reprodukív rendszerre kifejtett hatásának jobb megértését szolgálja.

2.1. A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli út vonal

A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) szignál út vonal a jelátviteli hálózat egyik legősibb út vonala. Valamennyi eukariótában megtalálható evolúciósan konzervált kaszkád, mely számos extra- és intracelluláris jelre válaszol. A MAPK-ok együttműködve más jelátviteli út vonalakkal ezeket a jeleket génexpressziós változásokká alakítják, ami által a sejtek működését szabályozzák. Rendkívül sokféle feladatot hajtanak végre, olyan alapvető fiziológiai folyamatokat szabályoznak mint a sejtproliferáció, -differenciáció, -túlélés és gyulladási folyamatok (Zhang és Dong, 2007).

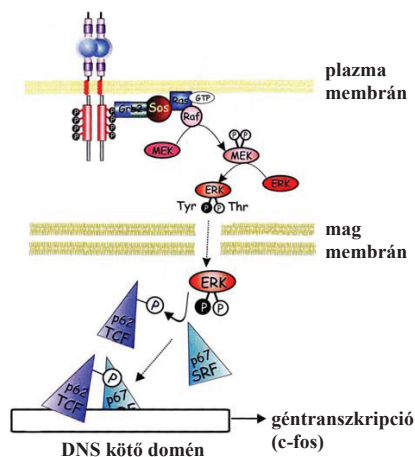
A MAPK-ként elnevezett szerin/treonin kinázoknak három fő funkcionális csoportját különböztetjük el, melyek szerkezetüket tekintve rokonságot mutatnak, de különböző, specifikus biológiai folyamatokat szabályoznak. Ezek közül a c-jun NH2-terminális kinázok (**JNK**) és a **p38 MAPK**-ok stresszre és inflammatorikus citokinekre adott celluláris válaszokban vesznek részt, az extracelluláris szignál-regulált kinázok (**ERK**) szerepe pedig mitogén és differenciációs szignálválaszokban, valamint gyulladási folyamatokban egyaránt bizonyított. Valamennyi MAPK szerkezetében közös, hogy tartalmaznak egy Thr-X-Tyr motívumot, aktivációjukhoz pedig mind a treonin, mind a tirozin foszforilációja szükséges. Ez az aktiváció egy kaszkádszerű foszforilációs mechanizmus segítségével történik: egy MAPK kináz kináz (MAPKKK) foszforilál és

ezáltal aktivál egy MAPKK kinázt (MAPKK), ami végül a MAPK-okat aktiválja (Roux és Blein, 2004; Chen és Thorner, 2007).

2.1.1. Az extracelluláris szignál-regulált kináz1/2 (ERK1/2) jelátviteli útvonal

A dolgozatban a MAPK-ok funkcionális csoportjai közül az extracelluláris szignál-regulált kinázok működését tanulmányoztuk, így ezt az útvonalat a továbbiakban részletesebben ismertetem.

Az ERK családnak hét tagja ismert (ERK1-7), ezen kívül számos ERK-függő proteint is leírtak. Az **ERK1** 44-, az **ERK2** pedig 42 kDa-os szerin-treonin kináz, 90%-os szekvenciahomológiával. A legtöbb, de nem az összes emlős szövetben expresszálódnak, az ERK2 expressziós szintje viszont általában magasabb. Funkcionálisan azonban ekvivalensek és nem tisztázott, miért kódolja őket két gén. Az aktiváció során az ERK1 a Thr202/Tyr204, az ERK2 pedig a Thr185/Tyr187 maradékokon foszforilálódik. Az ERK-



ek prolin-irányított protein kinázok, vagyis prolin melletti szerin vagy treonin maradékokat képesek foszforilálni. Az ERK1/2 több mint ötven szubsztráttal rendelkezik: az aktivált ERK növekedési faktor-érzékeny targeteket regulál a citoszólban, illetve transzlokálódik a sejtmagba, ahol számos génexpressziót szabályozó transzkripciósfaktort foszforilál (Roux és Blein, 2004).

Az ERK1/2 útvonal esetében MAPKK kinázként a Raf, MAPK kinázként a MEK és MAPKK-ként az ERK1/2 szerepel. Hormonok, növekedési faktorkok, differenciációs

1. ábra. Az ERK1/2 jelátviteli kaskád

Rövidítések: GTP: guanidin trifoszfát, Tyr: tirozin, Thr: treonin (Átvéve és átalakítva: Gomperts és mtsai, Signal Transduction, 2002).

faktorok és tumor ágensek egyaránt aktiválják ezt az útvonalat. Az ERK1/2 jelátviteli útvonal elsősorban **receptor protein tirozin kinázokon** keresztül aktiválódik. Ezek a receptorok ligandumaik megkötése után dimerizálódnak, majd az intracellulárisan található tirozinkináz régió a szomszédos receptor tirozindalláncait foszforilálja. A receptoron

kialakult foszfortirozin mintázatot egy adaptor fehérje, a **Grb2** ismeri fel, mely a guanin kicserélő faktorrall (**SOS**) komplexet képezve a tirozin oldalláncokon foszforilált receptorhoz kapcsolódik. Ezáltal a Grb2/SOS komplex a plazmamembrán közelébe kerül, ahol katalizálja a guanin nukleotid cserét a Ras fehérjén, ami aktiválja a Rast. Az aktivált Ras a szerin/treonin protein kináz Raf-hoz kötődik, mely ezáltal aktiválódik és egyúttal a sejtmembrán közelébe kerül. Az aktivált Raf szubsztrátja a **MEK**, egy kettős specificitású szerin/treonin-tirozin kináz, ami végül az **ERK1/2**-t foszforilálja. A foszforilált ERK1/2 dimerizálódik, majd olyan fehérjékkel lép interakcióba, melyek a sejtmagba irányítják (transzlokáció), ahol a géntanszkripciót befolyásolja. Az aktiválódott ERK1/2 a magi transzlokáció után transzkripciós faktorokat és más kinázokat foszforilál (Deak és mtsai, 1998). Legjobban ismert transzkripciós faktor szubsztrátjai a „ternary complex” faktorok (**TCF**), melyek a szérum válasz faktorokkal (**SRF**) komplexet képezve számos mitogén indukálható gén, például a c-fos átírását szabályozzák (Gomperts és mtsai, 2002; 1. ábra). A foszforilált ERK1/2 dimerizáció után olyan fehérjékkel lép interakcióba, melyek a sejtmagba irányítják (transzlokáció), ahol a géntanszkripciót befolyásolja, ugyanakkor az aktivált ERK1/2 citoplazmatikus szubsztrátokon keresztül is képes mediálni a biológiai folyamatokat. Az ERK citoplazmatikus szubsztrátjai között szerepelnek például az ERK1/2 útvonal komponensei, a MAPK-interakciós kináz (**MNK**) (Knauf és mtsai, 2001) és a 90 kDa-os riboszomális protein S6 kináz (**RSK**) (Xing és mtsai 1996).

2.1.2. Az ERK1/2 útvonal szerepe a biológiai folyamatokban

A soksejtű szervezetek **homeosztázisának megőrzésében** fontos szerep jut az ERK aktivitás nagyon precíz tér- és időbeli szabályozásának. A foszforilációs kaszkád elrendezése egyrészt a jelerősítést szolgálja, másrészt ez teszi lehetővé az aktivitás kinetikájának, időtartamának és amplitúdójának finoman hangolhatóságát. Az útvonal két komponense, a Ras és a Raf proto-onkogének. Ennélfogva nem meglepő, hogy a kaszkád fő funkciója a **növekedés regulációja**: a sejtproliferáció, -transzformáció, -differenciáció és az apoptózis befolyásolása (Wang és mtsai, 2003; Nozaki és mtsai, 2001). Az ERK1/2 útvonal ezeket a hatásokat különböző molekulák aktivitásának befolyásolásán keresztül valósítja meg. Az ERK1/2 jelátviteli út aktiválódása lényeges például a cyclin D1 indukciója szempontjából, molekuláris kapcsolatot teremtve ezzel az ERK szignál és a sejtciklus szabályozása között (Lavoie és mtsai, 1996). Egyre több bizonyíték van arra is, hogy az ERK1/2 útvonalnak fontos szerepe van az **idegi plaszticitásban**, a **kognitív**

funkciókban, a tanulásban és a memória kialakulásában (Sweatt, 2004; Kelleher és mtsai, 2004; Thomas és Huganir, 2004; Giovannini, 2006).

Az ERK jelátviteli kaszkádnak fontos szerep jut a **neuroprotektív folyamatokban** is. Az ERK aktivációján keresztül valósul meg például a hippocampalis CA1 idegsejtek túlélése ischiemiát követően (Park és mtsai, 2004) vagy a Parkinson betegségben kulcsszerepet játszó dopaminerg neuronok protekciója (Cavanaugh és mtsai, 2006); ugyanakkor az ösztrogén neuroprotektív hatását is közvetítheti az ERK: glutamát toxicitás után primer corticalis neuronokban a PD98059 MAPK inhibitor blokkolja az ösztrogén idegsejteket védő hatását (Singer és mtsai, 1999).

Míg a JNK/p38 MAPK útvonal a pro-apoptotikus folyamatokhoz, addig az ERK útvonal aktiválódása az **anti-apoptotikus folyamatokhoz** köthető. Az ERK kaszkád stimulációjának hatására foszforilálódik például a sejtek túlélésében fontos szerepet játszó Bcl2 (Deng és mtsai, 2000), szupresszálódik az apoptotikus hatású BAD (Hayakawa és mtsai, 2000) vagy akumulálódik a p53 tumor szupressziós protein (Persons és mtsai, 2000). Az ERK útvonal rendellenes működése, konstitutív aktivációja azonban közös jellemzője különböző típusú humán tumoroknak, így az ERK kaszkád egyes komponensei megfelelő célpontok lehetnek rákellenes szerek kifejlesztéséhez is (Kohn és Pouyssegur, 2006). Ugyanakkor az ERK útvonal megfelelő működése nélkülözhetetlen az apoptotikus-antiapoptotikus folyamatok közötti egyensúly megőrzésében.

Az ERK1/2 szignálkaszkád fontos szerepet tölt be az **immunrendszer működésének** szabályozásában is (Zhang és Dong, 2005), a természetes és az adaptív immunfolyamatokban egyaránt nélkülözhetetlen.

2.2. Az ösztrogén hatásmechanizmusa

A doktori értekezésem egyik célkitűzése az ERK1/2 szignálkaszkád gonadális szteroid, elsősorban ösztrogén függésének tanulmányozása volt az agyban, mivel újabb ismereteink szerint az ösztrogén a jelátviteli útvonalak módosításán keresztül is érvényesítheti hatását.

A gonadális szteroidok, köztük az ösztrogén hatásának mechanizmusa alapján **közvetlen genomiális, közvetett genomiális és nem-genomiális** hatásokat különítünk el (Lee és McEwen, 2001). A szteroid hormonok klasszikus, régóta ismert és vizsgált hatásukat a közvetlen genomiális útvonalon keresztül fejtik ki. Ebben az esetben a szteroid hormonok intracelluláris receptoraikhoz való kötődésük után közvetlenül módosítják a géntranszkripciót, míg közvetett genomiális hatásait jelátviteli útvonalakon keresztül valósítják meg. Ennek az útvonalnak a felismerése és tanulmányozása viszonylag újkeletű,

a plazmamembrán-asszociált szteroid hormon receptorok felfedezésével került előtérbe. Mivel a szignálkaskádók módosítása szintén vezethet géntranszkripciós változásokhoz, ezért a kétféle mechanizmust - szerepét tekintve - nem lehet élesen elválasztani egymástól, a biológiai hatás eléréséhez vezető út azonban lényegesen eltér egymástól. A szteroid hormonok hatásának harmadik csoportja a nem-genomiális mechanizmus. Ennek során a szteroid hormonok a génátírás szabályozása nélkül is kifejthetik hatásukat.

Az irodalom a legtöbb esetben azonban csak két csoportot különít el: a közvetlen genomiális hatásokat, melyeket **klasszikus/genomiális** hatásoknak nevez és a közvetett genomiális és nem-genomiális mechanizmust magában foglaló **nem-klasszikus/nem-genomiális** hatásokat. Ezért a dolgozat további részében - a könnyebb érthetőség kedvéért - ezt a csoportosítást, és a klasszikus, nem-klasszikus nevezéktant használok. A klasszikus és nem-klasszikus hatásokat ez alapján a következő szempontok szerint különböztetjük meg ill., különítjük el egymástól. A klasszikus hatások lassabbak, géntranszkripciós változásokat ugyanis csak órák, napok múlva figyelhetünk meg, ezenkívül transzkripciós (aktinomicin D) és translációs inhibitorokkal (cikloheximid) gátolni lehet a hatás létrejöttét (Falkenstein és mtsai, 2000). A nem- klasszikus hatások ezzel szemben gyors válaszokkal jellemezhetők, mivel a hatások már percek, másodpercek múlva mérhetők. A válasz transzkripciós ill., translációs inhibitorok jelenlétében is létrejön.

2.2.1. Klasszikus hatások

Az ösztrogén klasszikus hatásait magi receptorain keresztül érvényesíti. A *nukleáris ösztrogén receptorok (ER)* ligand-aktivált transzkripciós faktorok, melyek **közvetlenül a génexpressziót szabályozzák**. Két formájuk ismert: az 1985-ben klónozott *ERα* (Walter és mtsai, 1985) és a nemrég, 1996-ban felfedezett *ERβ* (Kuiper és mtsai, 1996). A két receptor nagymértékben homológ, a DNS-kötő doménjük 95%-ban azonos, a transzkripciós aktivitásért felelős ligandkötő doménjük (AF-2 domén) azonban csak 55%-ban egyezik meg (Kuiper és mtsai, 1996). Ez a különbség és eltérő szöveti eloszlásuk különböző funkcionális szerepüket veti fel.

Az ösztrogén lipofil tulajdonsága révén egyszerű diffúzióval jut át a plazmamembránon, majd a receptorához kötődik, aminek hatására a receptor olyan konformáció változáson megy keresztül, melynek eredményeképpen a receptort inaktív formában tartó hősokk fehérjék (pl. Hsp90) leválnak a receptorról, lehetővé téve a receptor-ligand komplex áthelyeződését a citoszólból a magba, valamint a receptor dimerizációját. A receptor, a dimerizáció után nagy affinitással kötődik a kromatinhoz és

többféle mechanizmussal szabályozza a génátírást. Az ösztrogén-ER komplexek egyrészt a célgének promoterének klasszikus inverz vagy nem-klasszikus ösztrogén válasz eleméhez (ERE) kötődnek, másrészt fehérje-fehérje interakciók révén is módosítják a génátírást: interakcióba léphetnek például olyan transzkripciós faktorokkal mint az 1-es típusú aktivátor protein (AP-1) vagy az RNS polimeráz II komplex fehérjék (McKenna és mtsai, 2000). A géntranszkripció szabályozásában ún. koaktivátor és korepresszor fehérjék is részt vesznek. A koaktivátor fehérjéket a ligand megkötése toborozza a receptorhoz, melyek az általános transzkripciós faktorokkal való kölcsönhatásuk révén módosítják a génátírást, míg a korepresszorok a receptorhoz kötődnek és ligandkötés hatására válnak le róla, és ezáltal vesznek részt a szabályozásban. A két nukleáris receptor különböző géneket aktiválhat (Paech és mtsai, 1997), s ezáltal eltérő biológiai funkciókat szabályozhat; ismert ugyanakkor az is, hogy a két receptor heterodimereket is képez in vivo (Cowley és mtsai, 1997, Pettersson és mtsai, 1997). A génaktiváció mellett a géntranszkripció gátlása is fontos szerepet játszik az ösztrogén hatások kialakulásában (Valentine és mtsai, 2000).

2.2.2. Nem-klasszikus hatások

Az ösztrogén gyors, nem-klasszikus hatásai - legalábbis részben - a **jelátviteli útvonalak módosításán** keresztül érvényesülnek. Olyan konvencionális szignálmolekulákat aktiválnak, mint a foszfolipáz C, adenilát cikláz, protein kináz A és C, extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK), ami által megváltoztathatják az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, a cAMP szintet vagy például az intracelluláris pH-t is. Mivel az említett jelátviteli útvonal komponensek főként a citoplazmában ill., a plazmamembrán közelében találhatók, ezért az ösztrogén a szignálkaskádok aktiválásán keresztül sokféle sejtfunkciót befolyásol a membránban (például ioncsatornákat nyit) és a citoplazmában, másrészt, mivel sok esetben a jelátviteli útvonalak végső célpontja is a genom, ezért a génextpressziót, a protein szintézist is szabályozza. Így a klasszikus és nem-klasszikus hatások biológiai szerepe átfed ill., kiegészíti egymást (Wong és mtsai, 1996).

A gyors hatásokat közvetítő *receptorok* feltehetően a *plazmamembránban* vagy annak közelében, a *citoplazmában* találhatók, a receptorok pontos azonosítása, szubcelluláris lokalizációjának felderítése azonban még nem történt meg, ez napjaink kutatásának feladata. Az ösztrogént kötő membránfrakció létezésére Pietras és Szego szolgáltatta az első bizonyítékot, akik specifikus ösztrogén-kötő fehérjét írtak le az endometriális sejtek membránjában (Pietras és Szego, 1977). Ezidáig membrán lokalizációs szekvenciával rendelkező, a magi ER-októl szerkezetileg különböző ER

izoformát nem sikerült azonosítani. Azonban számos *in vitro* ill., *in vivo* tanulmány is bizonyítja, hogy a membrán ösztrogén receptorok azonosak lehetnek az ismert nukleáris ösztrogén receptorokkal (Migliaccio és mtsai, 2000; Kousteni és mtsai, 2001; Wade és mtsai, 2001; Song és mtsai, 2002). Eszerint az elképzelés szerint a klasszikus ER-ok egy része a membránban, elsősorban olyan specifikus membránstruktúrákhoz, kaveolákhoz kötve található (Chambliss és mtsai, 2002; Boulware, 2007), melyek jelátviteli molekulákat toboroznak. Egyes adatok szerint a magi ER-ok poszt-transzlációs módosítása, foszforilációja (Balasenthil és mtsai, 2004; Wang és mtsai, 2002) vagy palmitilációja vezethet a klasszikus ER-ok transzlokációjához (Acconcia és mtsai, 2004; Li és mtsai, 2003), míg más kísérletek eredményei olyan adaptor proteineknek tulajdonítanak szerepet a receptorok áthelyeződésében mint az Shc (Evinger és mtsai, 2005) vagy az MNAR (“modulator of nongenomic action of estrogen receptor”) (Boonyaratanakornkit és mtsai, 2004). Több bizonyíték létezik arra vonatkozóan is, hogy az ösztrogén nem-klasszikus hatásait más, a klasszikus receptoroktól szerkezetileg eltérő receptorokon keresztül fejt ki. *In vitro* neocorticalis kultúrában azonosították az ER α -tól és az ER β -tól funkcionálisan különböző, kaveola-szerű mikrodoménekben gazdag, az ERK1/2 útvonalat aktiváló plazmamembrán-asszociált ösztrogén receptort (ER-X). Ez azonban nem expresszáldódik konstitutívan az agyban, az egyedfejlődés során jelenik meg, felnőtt állatban pedig csak ischemia-okozta agyi sérülés után mutatták ki. (Toran-Allerand és mtsai, 2002). Az 1990-es évek végén több csoport is klónozott egy új G fehérje kapcsolt receptort, a GPR30-at (Carmeci és mtsai, 1997; O’Dowd és mtsai, 1998; Owman és mtsai, 1996; Takada és mtsai, 1997), amit később az ERK1/2 útvonalat aktiváló ösztrogén receptorként azonosítottak (Filardo és mtsai, 2000).

Az ösztrogén a fehérje expresszió módosítása nélkül, a **neuronális aktivitás gyors megváltoztatásán** keresztül befolyásolhatja a sejtfunkciókat. Kelly és munkatársai már 1977-ben kimutatták, hogy az ösztrogén nagyon rövid latencia idővel (milliszekundumos tartomány) képes megváltoztatni az egy-sejt aktivitást a patkány medialis preopticus-septalis régiójában (Kelly és mtsai, 1977). Azóta többféle fenotípusú idegsejtben is bizonyították az ösztrogén neuronális excitabilitást módosító hatását. Az ösztrogén hypothalamicus (proopiomelanocortin (POMC), dopamin, GABA, GnRH) célsejtjeiben például a K⁺ csatornák modulálásán keresztül befolyásolja a sejtek ingerlékenységét (Malyala és mtsai, 2005).

Az ösztrogén nem-klasszikus hatásait a célsejtek **membrán fluiditásának megváltoztatásával** is kifejezheti, mivel lipofil természeténél fogva beépülhet a sejtek

plazmamembránjába és a lipid-lipid interakciók módosításával megváltoztathatja a membrán funkciókat a membrán-kötött enzimek mobilitásának és aktivitásának befolyásolásán keresztül (Karen és mtsai, 2000).

2.2.3. Az ösztrogén gyors, nem-klasszikus hatásai az ERK jelátviteli útvonalon keresztül

Az ösztrogén **gyors hatásainak** egyik fontos közvetítője az ERK jelátviteli útvonal. Egyrészt ismert, hogy az ERK jelátviteli molekula aktivációja az ösztrogén receptor foszforilálásán keresztül fontos szerepet játszhat a receptor ligand-független aktivációjában (Kato és mtsai, 1995), másrészt az ösztrogén számos sejttípusban aktiválja az ERK1/2-t percekben belül. Az idegsejtekben a membrán számára átjárhatatlan, borjú szérum albuminhoz (BSA) kötött ösztrogén gyors ERK1/2 aktivációt vált ki, ami a korai átíródású gének, például a c-fos átírásához vezet, amely azután további - az ösztrogén biológiai hatásának kialakulásához szükséges - **géneket aktivál** (Watters és mtsai, 1997). Hasonló gyors aktiváció figyelhető meg az oszteoblaszt sejtekben, ahol a sejtek túlélésében játszik szerepet (Kousteni és mtsai, 2001) vagy az MCF-7 mellrák sejtekben is, ahol az ösztrogén-indukált sejtprolifерációhoz járul hozzá (Razandi és mtsai, 2000). Az ERK közvetlenül is stimulálhatja az ösztrogén-érzékeny célgéneket a genomban. Az ösztrogén-indukált prolaktin géntranszkripciójához például az ERK útvonal aktivációja szükséges (Watters és mtsai, 2000). Az ERK szignál útvonal tehát kapcsolatot teremt a klasszikus és a nem-klasszikus ösztrogén hatások között.

Az ösztrogén klasszikus és nem-klasszikus hatásainak megismerése ill., elkülönítése lényeges, mivel a két hatásmechanizmus **funkcionális különbséget** is jelenthet. Oszteoblaszt sejtekben kimutatták például, hogy az ösztrogén antiapoptotikus hatását a nem-klasszikus útvonalon keresztül, az Src/Shc/ERK jelátviteli útvonal aktiválásával, transzkripcióis aktivitás hiányában is kifejti (Kousteni és mtsai, 2001). A gyors hatások mechanizmusának pontos megismerése ezért lehetőséget adhat a szteroid hormonok, köztük az ösztrogén jótékony, valamint nemkívánatos hatásainak szétválasztására, az adott útvonalra specifikusan tervezett terápiás szerek kifejlesztésével.

A dolgozatban a gonadális szteroidok, elsősorban az ösztrogén ERK1/2 útvonalra kifejtett hatásait tanulmányoztuk különböző agyterületeken és a gonadotrop releasing hormon (GnRH) neuronokban. Korábban ugyanis számos tanulmány és saját vizsgálataink is igazolták, hogy az ösztrogén foszforilálja a cAMP-függő DNS válasz elemet kötő fehérjét (CREB) a nőstények anteroventralis periventricularis magjában (AVPV) és a

medialis preopticus areában (mPOA) *in vivo* (Gu és mtsai, 1996; Zhou és mtsai, 1996; Ábrahám és mtsai, 2003, 2004), valamint a GnRH idegsejtekben (Ábrahám és mtsai, 2003). Az egyik lehetséges jelátviteli kaszkád pedig, ami mediálhatja az ösztrogén CREB aktivációra kifejtett hatását, az ERK1/2 szignálút vonal (Shaywitz és mtsai, 1999; West és mtsai, 2001). Az aktivált ERK1/2 a mitogén- és stressz-aktivált protein kinázon vagy a riboszomális SG kinázok (RSK1-3) segítségével foszforilálhatja a CREB-et (Xing és mtsai, 1996; Deak és mtsai, 1998; Shaywitz és mtsai, 1999).

2.3. Az ösztrogén hatások nemi dimorfizmusa

Az ösztrogén sokrétű hatást fejt ki a szervezetben. Amellett, hogy fontos szerepet játszik a reprodukcióval kapcsolatos funkciók (gonádok fejlődése és működése, szexuális viselkedés) szabályozásában, szerepe van a csontszövet és az erek integritásának megőrzésében, befolyásolja az immunrendszer működését, valamint az idegrendszeri funkciókat is.

Az ösztrogén hatásai **nemi különbségeket** mutatnak. Az ösztrogén a szaporodás szabályozását a hypothalamus-hypophysis-gonád tengely és a szexuális viselkedés regulálásán keresztül valósítja meg. (MacLusky és mtsai, 1981). A szaporodás fiziológiájában a luteinizáló hormon (LH) szekréció jellege jelenti talán az egyik legjelentősebb nemi különbséget. Felnőtt nőstényekben ugyanis az ösztroz ciklus proösztroz stádiumában a plazma megemelkedett ösztrogén szintje nagymértékű GnRH ill., LH szekréciót hoz létre, és ezáltal ovulációt vált ki, hímekben azonban az ösztrogénnek nem figyelhető meg hasonló hatása (Herbison, 1998). Az ösztrogén különbözőképpen hat hímekben és nőstényekben számos - a reprodukciótól független - folyamatban is, mint például a sejtosztódás, a sejthalál szabályozása, a kognitív és memória funkciók meghatározása, az idegi plaszticitás és az idegsejtekre kifejtett morfológiai hatások (Czlonkowska és mtsai, 2003; Gazzaley és mtsai, 2002; Dominguez és mtsai, 2004).

Az egyedfejlődés során az ösztrogén lényeges szerepet tölt be a szaporodás és az egyéb homeosztatisz folyamatok szabályozásában egyaránt fontos szexuálisan dimorf idegi hálózatok kialakulásában és szerveződésében is, azáltal, hogy részt vesz a neurogenesis, az idegi sejt migráció, az axonális növekedés irányításában és a szinaptogenesis regulálásában (Simerly és mtsai, 2002). Többek között ösztrogén-függő mechanizmusok tehetők felelőssé például a nemi különbséget mutató medialis preopticus area kialakulásáért. Ez a terület a hím szexuális viselkedés fő szabályozó régiója, mely

hímekben több sejtet tartalmaz és más idegi kapcsolatokkal rendelkezik, mint nőtényekben (Madeira és mtsai, 1999). Ez a strukturális és neurokémiai különbség magyarázatot adhat a felnőttkori szexuális viselkedés nemek közti különbségeire (Simerly és mtsai, 2002).

Az ösztrogén nemi különbségeket létrehozó hatásának pontos mechanizmusa az agyban azonban nem tisztázott. Az egyik lehetőség, hogy a nemi különbségek **molekuláris szinten érvényesülnek**: néhány agyterület ugyanis különböző ösztrogén receptor eloszlást mutat hímekben és nőtényekben (Zhang és mtsai, 2002). A transzkripciót ösztrogén receptorokon keresztül aktiváló vagy gátló koaktivátor és korepresszor gének szövet-specifikus expressziós mintázata szintén különbözik a két nemben (Tetel és mtsai, 2002; Auger és mtsai, 2002). A molekuláris szinten érvényesülő nemi különbségekre adnak újabb bizonyítékot a csoportunkban korábban végzett kísérletek eredményei, mely szerint az ösztrogén **CREB foszforilációt** okoz a nőtény egerek medialis preopticus területén, míg hímekben hiányzik ez a hatás (Ábrahám és mtsai, 2005).

Jelen tanulmányunkban a nemi különbségeket mutató CREB foszforiláció ERK-függését vizsgáltuk, mivel ismert, hogy a CREB-et sok esetben az “up-stream” elhelyezkedő ERK jelátviteli útvonal aktiválja (Shaywitz és Greenberg, 1999; West és mtsai, 2001). Ugyanazt az *in vivo* modellt használtuk, mint a CREB tanulmány esetében: kvantitatív immunhisztokémia segítségével, különböző agyterületeken meghatároztuk a hímek és a nőtények közötti endogén különbségeket, valamint a gonadektómia és az ösztrogén kezelés ERK1/2 foszforilációra kifejtett hatásait.

2.4. A hypothalamus-hypophysis-gonád tengely

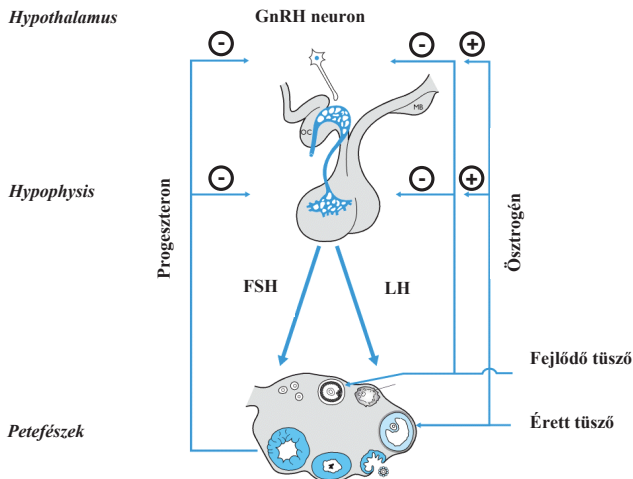
A petefészekben termelődő ösztrogén - a hypothalamus-hypophysis-gonád tengely részeként - központi idegrendszeri irányítás alatt áll; a hypothalamusban és a hypophysisben termelődő hormonok szabályozzák a szintézisét és ürülését.

A **hypothalamusban** ill., az előagyban elhelyezkedő **GnRH** vagy más néven luteinizáló hormon releasing hormon (LHRH) neuronok képviselik a kimenetét annak az idegi hálózatnak, mely számos külső és belső hatást integrál, és ezen keresztül szabályozza az emlősök reprodukciójában szerepet játszó hormonok szekrécióját hímekben és nőtényekben egyaránt (Herbison és Pape, 2001).

Az eger agyban kevés, összesen kb. 800 GnRH neuron található, melyek sejttestjei meglehetősen szétszórtnak helyezkednek el a hypothalamusban és az előagyban. A sejtek zöme a Broca-féle diagonális köteg mentén, a medialis septumban (**MS**), az organum

vasculosum laminae terminalis (**OVLT**) környékén, az anteroventralis periventricularis magban (**AVPV**), a medialis preopticus areában (**mPOA**) és az anterior hypothalamusban (**AH**) foglal helyet (Yoon és mtsai, 2005).

Az ezekben a sejtekben termelődő és epizodikusan szekretálódó GnRH dekapeptid hatására az **adenohypophysis** gonadotrop sejtjeiben follikulus stimuláló hormon (**FSH**) és luteinizáló hormon (**LH**) szecernálódik. Az FSH a tüszők érését indítja meg, míg a tüszők hormonszekrécióját az FSH és az LH együttesen hozzák létre. A két gonadotrop hormon hatására a **petefészekben ösztrogén** ill., elsősorban az LH hatására **progeszteron** termelődik. A hypophysisben, valamint a hypothalamusban termelődő hormonok szekrécióját az ovariális szteroidok - elsősorban az ösztrogén - feedback mechanizmusok révén szabályozzák mind a hypothalamus, mind a hypophysis szintjén. A vér ösztrogén szintje ösztrozis idején alacsony, a metösztrusz és a diösztrusz fázisában emelkedik, majd a proösztruszban éri el maximumát. Az ösztrozis ciklus során alapszinten szekretálódó ösztrogén és progeszteron a hypothalamus-hypophysis tengelyre ható **negatív visszacsatolással** gátolja az LH elválasztását. Proösztruszban a már nagy mennyiségben termelt ösztrogén viszont **pozitív visszacsatolási** mechanizmussal serkenti az LH szekréciót, LH-csúcsot hoz létre, ami kiváltja az ovulációt (2. ábra).



2. ábra. A hypothalamus-hypophysis-gonád tengely szabályozási sémája

Rövidítések: FSH: follikulus stimuláló hormon, LH: luteinizáló hormon. (Az ábra forrása: Nussey és Whitehead, Endocrinology: An Integrated Approach, 2001)

2.5. A GnRH neuronok ösztrogén általi szabályozásának lehetséges módjai

Bár a GnRH neuronok működésének ösztrogén-függése régóta ismert, a mechanizmusról, melyen keresztül hatását kifejti, keveset tudunk. Az ösztrogén receptorok jelenléte a GnRH idegsejtekben sokáig vitatott volt. Az ER kimutatására irányuló sikertelen kísérletek nyomán született meg és vált elfogadottá az a nézet, miszerint a GnRH sejtek nem rendelkeznek ER-ral, s ennél fogva az ösztrogén hatásai elsősorban **közvetett módon** érvényesülnek: hatásukat ER-ral rendelkező **interneuronok** és/vagy **glia sejtek** közvetítik (Herbison, 1998; Mahesh és mtsai, 2006). A preopticus areában található anteroventralis periventricularis mag (AVPV) például fontos szerepet játszik az LH-csúcs kialakításában. Ennek kísérletes bizonyítéka, hogy a terület léziója megszünteti az LH-csúcsot, míg az AVPV-be juttatott ösztrogén képes azt kiváltani (Wiegand és mtsai, 1980, 1982), a legújabb vizsgálatok pedig azt is igazolták, hogy az AVPV és a periventricularis mag ER α -t kifejező neuronjai közvetítik az ösztrogén pozitív feedback hatását (Wintermantel és mtsai, 2006). Az elmúlt évtized kutatásai azonban az ER β mRNS és fehérje expresszióját egyaránt igazolták a GnRH idegsejtekben (Skynner és mtsai, 1999; Hrabovszky és mtsai, 2000, 2001, Kalló és mtsai, 2001). Az ösztrogén tehát **közvetlen hatást** is gyakorolhat a GnRH neuronokra, mivel az ER β jelenléte ezekben a sejtekben egy ösztrogén-függő transzkripciós szabályozás meglétét feltételezi. Az ER β pontos fiziológias szerepét azonban eddig nem sikerült tisztázni, az ösztrogén GnRH neuronokra kifejtett **klasszikus** hatásai nem ismertek. Arra viszont van adat, hogy az ösztrogén **gyors, nem-klasszikus** hatásainak közvetítésében részt vehet az ER β . Ábrahám és mtsai kimutatták ugyanis, hogy az ösztrogén-indukált gyors CREB foszforiláció létrejöttéhez elengedhetetlen az ER β jelenléte (Ábrahám és mtsai, 2003). Az ösztrogén gyors hatása a GnRH neuronok elektromos aktivitására pedig már az ER β kimutatása előtt ismert volt, az ösztrogén megváltoztatja például a tengeri malac GnRH idegsejtek excitabilitását (Lagrange és mtsai, 1995).

Bár az ER β funkciója nem ismert, indirekt bizonyítékok alapján feltételezhető, hogy részt vesz az ösztrogén negatív feedback hatásának létrehozásában: a homozigóta ER β knock-out (ER β KO) egerek kevésbé fertilibek (Krege és mtsai, 1998), továbbá az ERKO egerek nem mutatnak LH szint növekedést gonadektómiát követően, az akut ösztrogén kezelés pedig nem gátolja az LH szekréciót az ER β KO egerekben (Ábrahám és mtsai, 2003). Mivel a negatív feedback létrehozásában az ösztrogén gyors és közvetlenül a genomon érvényesülő hatásai is szerepelhetnek, ezért az ösztrogén GnRH neuronokra

kifejtett nem-klasszikus és klasszikus hatásainak felderítése közelebb vihet a hypothalamus-hypophysis-gonád tengely szabályozásának megértéséhez. A dolgozat első részében bemutatott kísérletek a gonadális szteroidok, elsősorban az ösztrogén nem-klasszikus, az ERK1/2 foszforilációra kifejtett hatását vizsgálják a GnRH idegsejtekben. Ezek a kísérletek az ERK1/2 útvonal fiziológias folyamatokban betöltött szerepét próbálják feltárni a GnRH neuronokban.

A dolgozat további részében bemutatott kísérletekben arra kerestük a választ, hogy a fiziológias folyamatoktól eltérő, aktivált állapotban, például immunológiai kihívás során hogyan változik meg az ERK1/2 szignálaskad működése. Az immunológiai stimulus kiváltásához humorális immunválaszt indukáltunk a kísérleti állatokban.

2.6. A humorális immunválasz folyamatának rövid áttekintése

Gerinces állatokban az evolúció során a fertőző ágensek leküzdésére kétféle immunrendszer fejlődött ki: a veleszületett (natív) vagy **természetes** és a szerzett (**adaptív**) vagy antigénre specifikus immunrendszer. A természetes immunitás filogenetikailag ősi, ez képviseli a kórokozók elleni védelem első vonalát, felismeri a kórokozó jelenlétét és természetét, ezenkívül alapvető szerepe van az adaptív immunválasz, a **humorális** vagy a **celluláris** immunválasz folyamatainak elindításában. Ha a természetes immunrendszer nem képes leküzdeni a patogént, az adaptív immunrendszer is aktiválódik. Ezt a folyamatot a patogén által stimulált makrofágokból, hízósejtekből és granulocitákból felszabaduló citokinek segítik, elsősorban gyulladás kialakulása által.

2.6.1. T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz

Azt, hogy az adaptív immunválasz során a humorális vagy a celluláris immunválasz aktiválódik-e, az antigén és az antigénprezentáló sejt (APC) kölcsönhatása határozza meg. Kölcsönhatásuk jellege dönti el, hogy a celluláris immunválaszt kiváltó Th1 vagy a humorális választ indukáló Th2 segítő T-sejtek aktiválódnak.

Az antigén típusa alapján a humorális immunválasz két nagyobb csoportját különböztetjük meg: a T-sejt-függő és a T-sejt független antigénre adott immunválaszt. A **T-sejt-függő antigének** fehérjetermészetűek, melyek önmagukban nem képesek aktiválni az ellenanyagtermelő B-sejteket, ehhez szükség van a T-sejtek segítségére: közvetlen

sejtkölcsönhatásra, melyet kostimulációs molekulák (CD40-CD40 ligandum kapcsolat) és a Th2 segítő T-sejtekből származó citokinek biztosítanak.

Ilyen B-sejteket aktiváló Th2-es citokin például az IL-4, az IL-5 és az IL-15. A T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz kialakításában a lépben és a nyirokcsomóban elhelyezkedő konvencionális B2 sejtek vesznek részt (Fagarasan, 2000), melyek aktivációjuk után plazmaszjtekévé érnek és az antigénnel fajlagosan reagáló ellenanyagot termelnek. Az ellenanyagok az antigén megfelelő epitópjához kapcsolódva opszonizálják az antigént, immunkomplexet hoznak létre, és így elősegítik az antigén fagocitózis útján végbemenő elpusztítását (opszonizált fagocitózis). A kialakuló immunkomplexek a komplementrendszer klasszikus útvonalának aktiválására is képesek, melynek során olyan komplementfragmensek keletkeznek mint például a C5a és C3a peptid. Ezeket a peptideket anafilatoxinoknak is nevezik, mivel az erek áteresztőképességét fokozó, gyulladást közvetítő anyagok felszabadulását idézik elő.

Az immunválasznak a fent leírt formája, a T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz, elsősorban extracelluláris kórokozók (vírusok, baktériumok) leküzdésében alapvető fontosságú, míg a humorális immunválasz T-independens formája elsősorban bakteriális fertőzések ellen irányul (Janeway és mtsai, 2001; Gergely és Erdei, 1998).

2.6.2. T-sejt-független antigénre adott humorális immunválasz

A T-sejtekkel nem rendelkező tímusz nélküli "nude" egerek T-sejtektől függő fehérjeantigénekre nem válaszolnak, míg számos nem fehérjetermészetű antigén ellenanyagtermelést válthat ki tímuszhiányos egerekben is. Ezeket az antigéneket tímusztól független vagy **T-sejt-független antigéneknek** nevezzük.

A legtöbb T-sejt-független antigén poliszacharid, glikolipid vagy nukleinsav természetű, és jellemző rájuk, hogy számos antigénepitópot hordoznak. Ezeket az antigéneket a hivatásos antigénprezentáló sejtek nem képesek feldolgozni és prezentálni a T-sejtek számára, ezért a konvencionális T-sejtek ezeket az antigéneket nem ismerik fel. Az antigének ismétlődő epitópjaik révén azonban a B-sejtek membrán immunoglobulinjait (mIg) hatékonyan kapcsolják össze, ami a B-sejtek T-sejt nélküli aktivációjához vezet. Ezek az ún. B1 sejtek, melyek T-sejtek nélkül is képesek aktiválódni, a hasüregben helyezkednek el (Fagarasan, 2000). A B-sejtek aktivációjához, ellenanyagtermelő sejté alakulásához a B-sejt receptor aktivációján kívül, ebben az esetben is szükség van egy második jelre, például a természetes immunrendszerből származó interferon gammára (IFN γ). Az eddig leírtakon kívül a T-independens és a T-dependens immunválasz között

további különbséget jelent, hogy a T-sejt-független antigénre, legalábbis a I-es típusú T-sejt-független antigénre adott válasza nem jellemző az izotípusváltás és a memóriasejt képződés.

Bár a T-independens válasznál a B-sejtek aktivációjához ill., az ellenanyagtermelő sejtek érésehez nincs szükség a T-sejtek segítségével, valójában ez az immunválasz is függ a T-sejtektől, mivel a T-sejtek, citokintermelésük révén az immunválaszt, bár különbözőképpen, de ebben az esetben is szabályozzák. Az IL4, IL-6 és az IL10-es Th2-es citokinek például az IL-12 termelését a T-sejt-függő és a T-sejt-független útvonal aktiválódása során is, de eltérő módon regulálják. Az IL4 például gátolja az IL12 szekrécióját a T-independens válasz során, míg fokozza azt a T-dependens immunválasz alatt (Takenaka és mtsai, 1997). A citokineknek (pl. a Th2-es és a makrofág eredetű citokineknek) ill., más gyulladásos komponenseknek tehát mindkét immunválasz folyamán fontos, de eltérő szabályozó szerepük lehet.

2.7. Neuro-immun interakciók: kétirányú kapcsolat az idegrendszer és az immunrendszer között

Az idegrendszer és az immunrendszer működése szorosan összefügg, a központi idegrendszer “üzeneteket” kap az immunrendszertől és fordítva: a központi idegrendszer befolyásolja az immunfunkciókat (Felten és mtsai, 1987; Blalock, 1989; Madden és Felten, 1995; Jiang és mtsai, 1998). Az immunválasz során a központi idegrendszer és az immunrendszer közötti *párbeszéd* lényeges a *homeosztázis* megőrzésében.

2.7.1. Az idegrendszer kommunikációja az immunrendszerrel

Az idegrendszer két útvonalon keresztül kommunikál az immunrendszerrel: az **autonóm idegrendszer** segítségével közvetlen idegi befolyás által és a **neuroendokrin rendszeren** keresztül, elsősorban a hypothalamusban és a hypophysisben termelődő és szekretálódó hormonok útján (Wrona, 2006).

Az autonóm idegrendszer egyik tagja, a **szimpatikus idegrendszer** széleskörű hatást gyakorol az immunfunkciókra (Hori és mtsai, 1995; Madden és mtsai, 1995, 2003). A szimpatikus idegrendszer aktivációja során katekolaminok (adrenalin, noradrenalin) szabadulnak fel a mellékvesevelőből és a szimpatikus idegvégződésekből, melyek az immunsejteken található adrenoreceptorokon keresztül számos immunparamétert módosítanak. A noradrenerg posztganglionáris szimpatikus idegvégződések beidegzik a

limfoid nyirokszerveket (Dénes és mtsai, 2005; Trotter és mtsai, 2007, Cano és mtsai, 2001), sőt nagyon közeli szinapszis-szerű kapcsolatokat alakítanak ki a limfocitákkal is (Stevens-Felten és Bellinger, 1997; Elenkov és mtsai, 2000), így az immunrendszer működését lokálisan, az idegvégződésekből felszabaduló noradrenalin és a mellékvesevelőből a keringésbe kerülő adrenalin egyaránt hangolja.

Újabb eredmények az autonóm idegrendszer másik tagjának, a **paraszimpatikus** kolinerg **rendszernek** is fontos szerepet tulajdonítanak az ideg- és az immunrendszer közötti kommunikációban (Tracey és mtsai, 2002; Pavlov és mtsai, 2003, Saeed és mtsai, 2005, Zimring és mtsai, 2005). A legújabb bizonyítékok szerint az acetilkolin szekretáló idegsejtek az immunsejteken található acetilkolin receptorokon keresztül szuppresszálják az akut gyulladást (Tracey és mtsai, 2002). Ezt a “gyulladáscsökkentő kolinerg útvonalat” az efferens vagus ideg új funkciójaként írták le (Czura és mtsai, 2003; Pavlov és mtsai, 2003).

Az immunsejtek a fent említett és egyéb neurotranszmitter ill., neuropeptid receptorokon kívül hormon receptorokat is kifejeznek, melyeken keresztül a neuroendokrin rendszer hormonjai befolyásolják az immunsejtek funkcióját. A **hypothalamus-hypophysis mellékvesekéreg tengely** “végpontjában” felszabaduló glükokortikoidok általános immunszuppresszív és gyulladáscsökkentő hatása például több mint 50 éve ismert (Elenkov és mtsai, 2000). A hypothalamusban és a hypophysisben termelődő egyéb hormonok immunműködésre kifejtett hatásáról ennél jóval kevesebbet tudunk, így például a hypothalamus-hypophysis-gonád tengely és az immunrendszer kölcsönhatásának mechanizmusa is kevésbé ismert.

2.7.2. Az immunrendszer kommunikációja az idegrendszerrel

A központi idegrendszert sokáig “immunológiai kiváltságos” helynek tekintették, mivel úgy gondolták, hogy nem képes immunválasz kialakítására és antigén prezentációra. Ez azonban csak részben igaz, az agy sajátos anatómiai jellemzőinek megfelelő immunreakciók ugyanis létrejönnek az agyban is, ezért helyesebb “immunológiai szempontból specializált helynek” nevezni (Pedemonte és mtsai, 2006). Ilyen anatómiai jellemző a nyirokkeringés hiánya, a specializált antigénbemutató sejtek mint a dendritikus sejtek és a mikroglia megléte, a másodlagos nyirokszervek hiánya és a mechanikai gátak mint a vér-agy-gát vagy a vér-cerebrospinalis folyadék gát jelenléte, melyek korlátozzák az immunsejtek vándorlását (Pedemonte és mtsai, 2006). A speciális immunszuppresszív mikrokörnyezet ellenére agyi sérülések, fertőzések vagy betegségek során a központi

idegrendszerben is kialakulnak gyulladási folyamatok, az idegrendszer sejtjei gyulladásos mediátorokat: proinflammatorikus citokineket, proszttaglandinokat, szabad gyököket és komplementeket termelnek, melyek aztán kemokineket és adhéziós molekulákat indukálnak, immunsejteket toboroznak és glia sejteket aktiválnak (Lucas és mtsai, 2006).

A kezdeti bizonyítékokat az immunrendszer kommunikációjára az idegrendszerrel Besedovsky és munkatársainak kísérletei adták. Azt találták, hogy az immunrendszer aktivációja a hypothalamus, az autonóm idegrendszer működésében és az endokrin folyamatokban zajló változásokkal jár együtt. A szerzők három nappal az immunkihívást követően nagyobb tüzelési frekvenciát detektáltak a hypothalamus ventromediális magjában, valamint megnövekedett szimpatikus aktivitást és jelentős emelkedést tapasztaltak a vér adrenocorticotrop hormon (ACTH) és kortikoszteron szintjében (Besedovsky és mtsai, 1977).

Az immunsejtek ezeket, és az ehhez hasonló idegrendszer működést módosító hatásukat többféle faktor segítségével közvetíthetik. Maguk az immunsejtek is termelnek és szekretálnak **hormonokat** mint például luteinizáló hormont (LH), prolaktint (PRL), növekedési hormont (GH), corticotropin-releasing hormont (CRH), adrenocorticotrop hormont (ACTH), **neuropeptideket** (enkefalinokat, endorfinokat) és **neurotranszmittereket** is (adrenalint, noradrenalint) (Blalock, 1989,1994). A limfociták és a makrofágok például endogén opioid peptideket és catekolaminokat szintetizálnak (Harbour és mtsai, 1987; Lolait és mtsai, 1984; Engler és mtsai, 2005), a humán limfociták továbbá növekedési hormont is szekretálnak (Hattori és mtsai, 1998). Mindezek mellett talán az immunrendszer legfontosabb kommunikációs "eszközei" a **citokinek** (Wrona és mtsai, 2006).

2.7.3. A citokinek és a proszttaglandinok szerepe

Az aktivált immunsejtek által szekretált citokinek amellet, hogy lényeges szerepet töltenek be a perifériás immunválasz szabályozásában, fontosak az immun- és idegrendszer közötti kapcsolatok kialakításában; az immunrendszer részben rajtuk keresztül - többféle mechanizmussal - befolyásolja az idegrendszer működését.

A perifériás citokinek egyrészt **közvetett módon** hatnak az agyban, melynek során az agyszövet saját citokin termelését idézik elő (Laye és mtsai, 1994), mivel az agy a mikroglia és az asztrociták révén saját citokin szekrécióra is képes. Az aktivált immunsejtekből származó citokinek többféle módon léphetnek be az agyba. Egyrészt a vér-agy-gát-mentes agyterületeken, a circumventricularis szerveken (pl. eminentia

mediana, organum vasculosum laminae terminalis, area postrema) keresztül (Banks és Kastin, 1985; Gutierrez és mtsai, 1993,1994), másrészt szállító fehérjék segítségével, aktív transzporttal vagy receptor-mediált mechanizmussal, az agyi erek endotéliumához kötődve központi mediátorok felszabadulását válthatják ki (Watkins és mtsai, 1995).

A perifériáról érkező citokinek **közvetlenül** is hathatnak az idegrendszerben, a perifériás afferens neuronok ingerlésével (Watkins és mtsai, 1995; Dantzer és mtsai, 1998; Goehler és mtsai, 2000). Ezzel a mechanizmussal az idegrendszer folyamatos tájékoztatást kaphat az immunrendszerben zajló általános eseményekről is. Közvetlen hatásukat úgy is kifejezhetik, hogy maguk a citokineket termelő immunsejtek vándorolnak be az agyba és ott ürítik mediátoraikat (Weller és mtsai, 1996). Végül a vagus ideg jelent egy másik nagyon fontos útvonalat, melyen keresztül a periférián termelt citokinek vagy a citokin-aktivált szignálok elérhetik az agyat (Fleshner és mtsai, 1995, Goehler és mtsai, 1997; Marvel és mtsai, 2004).

A citokinek fontos feladata, a kemokinekkel és a szelektinekkel együtt a leukociták toborzása a vér-agy-gáton keresztül az agyba fertőzések, valamint agyi sérülések során (Minghetti és mtsai, 1999; Bernardes és mtsai, 2001; Proescholdt és mtsai, 2002). Feltehetően a gyulladásos citokinek a leukocita migráció elindítói, mivel ezek képesek a kemokinek és a szelektinek termelését indukálni. Több kísérlet eredménye alapján a citokinek közül az interleukin-1 (IL-1) az egyik jelölt, melyet kulcs immuntranszmitternek tartanak az immunrendszer aktivációjának közvetítésében (Besedovsky és mtsai, 1986). Az IL-1 befolyásolja a hypothalamus neuroszekréciós aktivitását, közvetlenül fokozza például a corticotrop releasing hormone (CRH) neuronok aktivitását (Berkenbosch és mtsai, 1987; Sapolsky és mtsai, 1987). Az IL-1-et - más citokinekhez hasonlóan - nemcsak a perifériás makrofágok állítják elő, hanem mikroglia és asztrociták is (Van Eldik és mtsai, 2007, Giulian és mtsai, 1986; Fontana és Grob, 1984). Az IL-1 szerepét a leukocita bevándorlásban is igazolták. Az agykamrába adott IL-1 β az interferon-gammához (IFN- γ) és a tumor nekrosisz alfához (TNF- α) hasonlóan kiváltja a leukociták beáramlását (Ching és mtsai, 2005).

A citokinek az agysejtekre kifejtett stimuláló hatásukat sok esetben a prosztaglandin E₂ (PGE₂) szekréció növelésén keresztül érvényesítik (Blatteis és mtsai, 2005), melyeket a ciklooxygenáz enzim állít elő a sejtekben. A ciklooxygenáz (COX) vagy másnéven prosztaglandin (PG) H szintáz katalizálja a prosztanoidok, az arachidonsav metabolitok mint a PG-ok, a prosztaciklinek és a tromboxánok szintézisének első közös lépését (Minghetti, 2004). A COX enzimek (COX-1, COX-2) a nem-szteroid

gyulladáscsökkentő gyógyszerek ismert célmolekulái (Vane és Botting, 1998). Ilyen nem-szelektív COX-1, 2 inhibitor például a kísérleteinkben alkalmazott Indomethacin.

2.7.4. A hypothalamus-hypophysis-gonád tengely és az immunrendszer közötti

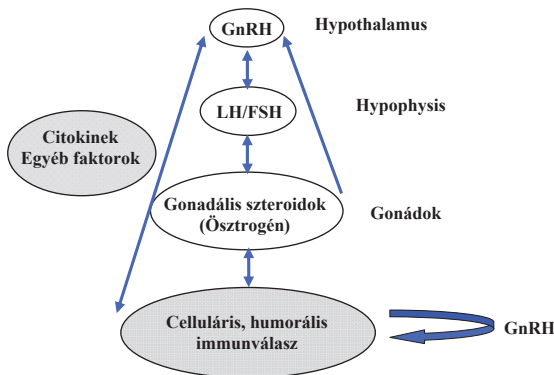
kölcsönhatások

Míg a neuro-immun-endokrin kölcsönhatások a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg (HPA) tengely vonatkozásában viszonylag jól ismertek, addig a fertilitást irányító hypothalamus-hypophysis-gonád (HPG) tengely és az immunrendszer interakcióinak mechanizmusa kevésbé feltárt.

Számos kísérletes és klinikai megfigyelés szól amellett, hogy a stressz a HPA tengely aktivitását növeli, a reprodukív funkciókat viszont csökkenti (Breen és Karsch, 2006), vagyis vészhelyzetben a szervezet megőrzi a mellékvesekéreg funkcióit a gonadális aktivitás terhére. Az **immunkihívás** a stressz egyik formája is lehet (immunstressz), ennek megfelelően az immunrendszeri zavarok gyakran járnak együtt a **reprodukív tengely** működésének gátlásával, így például a bakteriális és virális fertőzések befolyásolják a HPG tengely hormonjainak vérben mérhető szintjét és ezen keresztül a szaporodási képességet (Refojo és mtsai, 1998, Wang és mtsai, 1994). A bakteriális endotoxin (lipopoliszacharid vagy LPS) például a **citokin szekréció** növelésén keresztül gátolja a GnRH idegsejtek aktivitását (Refojo és mtsai, 1998). Az eddigi eredmények alapján az LPS ezen hatását főként az IL-1 β hozza létre. Az agykamrába adott akut IL-1 β injekció ugyanis jelentősen csökkenti az LH szintet petefészekirtott patkányokban (Rivier és Vale, 1989; Rettori és mtsai, 1991, Bonavera és mtsai, 1993) és felborítja a normális ösztrozis ciklust, megakadályozza az LH-csúcs létrejöttét (Rivier és Vale, 1990). Az IL-1 β krónikus adása is, az akut kezeléshez hasonlóan a GnRH neuronok aktivitásának csökkenésével jár (Rivest és mtsai, 1993).

A HPG tengely és az immunrendszer közötti kölcsönhatások másik vetülete a **reprodukív tengely hormonjainak** immunműködést módosító hatása. Ennek legkézenfekvőbb bizonyítékai az immunfunkciókban megjelenő nemi különbségek. Az autoimmun betegségek (rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erithrematosus) előfordulási gyakorisága például jóval nagyobb nőkben, mint férfiakban, mely különbség az ösztrogén szint csökkenésével (Tanriverdi és mtsai, 2003), posztmenopauzában megszűnik. A **GnRH** és a **gonadális szteroidok** hatnak az immunrendszer fejlődésére, a nyirokszervek és az immunsejtek érése ill., befolyásolják a humorális és a celluláris immunválaszt (Morale és

mtsai, 2001; Tanriverdi és mtsai, 2003). GnRH receptorok ugyanis mind az elsődleges nyirokszerveken, mind az immunsejteken megtalálhatók (Chen és mtsai, 1999; Marchetti és mtsai, 1989), ezenkívül az immunsejteknek saját GnRH termelésük is van (Chen és mtsai, 1999). Ennek a hypothalamuson kívül termelődő GnRH-nak a fízíológíás szerepérőí eddíg nem sokat tudunk. A gonadáíis szteroidoknak szintén vannak kötőhelyei az elsődleges nyirokszerveken és a perifériás immunsejteken ís (Kawashima és mtsai, 1992; Suenaga és mtsai, 1998; Viselli és mtsai, 1995; Kovacs és Olsen, 1987). Így a GnRH és a gonadáíis hormonok autokrin módon és a HPG tengely aktivációján keresztül ís befolyásolhatják az immunrendszer mőködését (3.ábra). A HPG tengely hormonjainak immunrendszerre kifejtett hatásának vizsgálata több okból ís fontos. A gonadáíis szteroidok szerepe a széíesískőíben alkalmazott hormonpótló terápiák és a fogamzásgátló gőígygyszerek elterjedt használata miatt, a GnRH szerepe pedig az utóbbi években például a korai pubertás vagy a prosztatara k kezelésében terápiás szerként alkalmazott GnRH agonisták miatt váílt különősen fontossá (Tanriverdi és mtsai, 2003).



3. ábra. A HPG tengely és az immunrendszer kölcsőínhatásai

A HPG tengely és az immunrendszer között kétírányú kapcsolat van. Az immunsejtek az általuk termelt citokíneken és egyéb faktorokon (neuropeptideken, neuroortanszmittereken, hormonokon) keresztül befolyásolhatják a HPG tengely mőködését; bár a funkciója nem tisztázott, de saját GnRH termelésük ís van, míg a HPG tengely hormonjai az immunsejtek mőködését, és ezen keresztül a humorális és a celluláíis immunváíaszt egyaránt módosítják.

2.8. Az ösztrogén szerepe az immunfolyamatokban

A perifériás immunválasz folyamatát ill., kimenetelét számtalan tényező befolyásolja. Ezek között szerepelnek a gonádális szteroidok, köztük az **ösztrogén**. Az ösztrogén módosítja a citokintermelést, az immunsejtek differenciálódását és az adhéziós/kostimulációs molekulák kifejeződését (Cutolo és mtsai, 2000, Elenkov és mtsai, 1997). Az ösztrogénpótló terápiában részesülő nőkben kimutatták, hogy csökken a monociták száma a vérben (Ben-Hur és mtsai, 1995), ill., az is ismert, hogy az ösztrogén kezelés növeli a monocitákon a Fas ligandum expresszióját (Mor és mtsai, 2003). Ezenkívül - a jelenleg elfogadott paradigma szerint - az ösztrogén elsősorban a humorális immunválaszt erősíti. Kimutatták ugyanis, hogy az ösztrogén kezelés növeli az ellenanyagtermelést (Kanda és Tamaki, 1999) és a Th2 típusú citokinek termelését, vagyis **Th2** irányú eltolódást okoz az immunválaszban (Ito, 2001, Salem és mtsai, 2004). Ezt igazolják az autoimmun betegségekből, a terhesség során tapasztalt jelenségek is. A magas ösztrogén szinttel jellemezhető terhesség alatt ugyanis jelentős javulást mutatnak a celluláris immunválaszhoz köthető autoimmun betegségben, például rheumatoid arthritisben vagy sclerosis multiplexben szenvedő nők (Confavreux és mtsai, 1998; Da Silva és mtsai, 1992), vagyis ebben az esetben az ösztrogén hatékony immunszuppresszív faktorként szerepel. Ezzel szemben azok a betegségek, amelyek a humorális immunválasz felerősödésének következtében alakulnak ki, mint például a szisztémás lupus erythematosus, jelentős mértékben súlyosbodnak a terhesség alatt (Petri és mtsai, 1991). Az ösztrogénnek azonban a Th2 választ erősítő hatása mellett a **Th1** típusú citokinek termelésére kifejtett pozitív hatását is megfigyelték (Lang, 2004), in vitro adatok szerint az ösztrogén fokozhatja például az IFN- γ kifejeződését (Gilmore és mtsai, 1997).

Az ösztrogén azonban nemcsak a periférián, hanem az agyban zajló gyulladásos folyamatokat is "ellenőrzése alatt tartja". Fiziológiai koncentrációban védelmet nyújt olyan neurodegeneratív betegségekből, melyek kialakulásában szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok, így az ischemiás stroke-ban vagy az Alzheimer-kórban is. Az ösztrogén neuronokra kifejtett közvetlen protektív szerepe még kérdéses, azt viszont tudjuk, hogy a mikroglia és az asztrocita ösztrogén receptorokat expresszál, és a proinflammatorikus ágensekre való érzékenységüket befolyásolja az ösztrogén. Molekuláris szinten pedig ismert, hogy számos, a gyulladás kialakításában részt vevő gén átíródását gátolja (Pozzi és mtsai, 2006). Ezt az idegsejteket védő hatását részben a jelátviteli útvonalak, köztük az ERK kaskád aktiválásával hozza létre (Dhandapani és

Brann, 2007; Guerra és mtsai, 2004). Az Alzheimer-kór korai stádiumában például jelentős mértékű ERK aktiváció figyelhető meg az asztrocitákban (Webster és mtsai, 2006).

A jelenleg elfogadott dogma szerint - a fent leírtaknak megfelelően - az ösztrogén neuroprotektív hatása immunszuppresszív sajátosságainak köszönhető. Újabb adatok azonban az ösztrogén neuroprotektív mechanizmusának egy másik aspektusát tárták fel. E szerint az ösztrogén jelenléte nélkülözhetetlen a megfelelő immunválasz kialakításához bakteriális és virális fertőzések során nőstény egerekben: az ösztrogén olyan fehérjék átíródásához szükséges a természetes immunválasz során, melyek az idegsejtek túléléséért felelős fehérjéket kódolnak (Soucy és mtsai, 2005).

2.9. A MAPK-ok szerepe az idegrendszeri gyulladásos folyamatokban és a neuroprotekción

A MAPK-ok fontos szerepet játszanak az immunválasz során nemcsak a periférián, hanem az agyban kialakuló gyulladásos folyamatokban is és az ösztrogén hatásait is közvetíthetik. A **gyulladás** során a gyulladásos sejtek toborzása, aktivációja és apoptózisa szigorúan regulált folyamatok. Ezek a folyamatok számos "ellenőrzési ponttal" rendelkeznek, melyek fontos szerepet játszanak a gyulladásos reakciók kimenetelének meghatározásában. Az egyik ilyen ellenőrzési pont az ERK1/2. Számos *in vitro* és *in vivo* adat támasztja alá, hogy az ERK szignál döntő szerepet játszik a gyulladásos mechanizmusának kialakításában az agyban (Pollak és mtsai, 2005; Wu és mtsai, 2006), ugyanakkor a gyulladás által indukált ERK1/2 aktivációnak fontos szerepe van az agyban zajló gyulladásos folyamatok hatásának közvetítésében is. Így például a gyulladás által aktivált ERK1/2 útvonalnak jelentős szerepe van a leszálló fájdalom pályák plaszticitásának létrehozásában (Imbe és mtsai, 2005) vagy a kortikális neuronok gyulladása által stimulált glutamát-függő sejthalál szabályozásában (Jara és mtsai, 2007).

Számos idegrendszeri betegség kórképének kialakulásához is hozzájárulnak a gyulladásos folyamatok. Kísérletesen és klinikailag egyaránt bizonyított például, hogy a stroke-ot akut és krónikus gyulladásos reakció követi, ami inflammatorikus citokinek termelésével és az agyba történő leukocita infiltrációval jellemezhető (Mehta és mtsai, 2007). Egyre több bizonyíték van arra is, hogy a MAPK szignáloknak döntő szerepe van az ischémiát követő sejt túlélés szabályozásában (Nozaki és mtsai, 2001; Mehta és mtsai, 2007). Az Alzheimer-kór patogenezisében szintén szerepe van a proinflammatorikus citokinek termelésének, hozzájárulnak a mikroglia aktivációhoz és a sejtpusztuláshoz. Bár az alapmechanizmusok nem ismertek, azt tudjuk, hogy a beta-amiloid megkötése a

sejtfelszínen különböző kinázok mint az ERK1/2 aktivációjához vezet, ami végül citokin expressziót eredményez (Ho és mtsai, 2005).

A sejtek túléléséhez vagy pusztulásához vezető eseményláncolat molekuláris mechanizmusának megértése segíthet a neuroprotekciónak megfelelő stratégiájának kidolgozásához. A jelátviteli útvonalak, köztük az ERK1/2 - például az inflammatorikus génexpresszió szabályozásával - terápiás targetként szolgálhatnak a gyulladás csökkentéséhez, és ezáltal a neuroprotekciónak (Zhang és Stanimirovic, 2002).

2.10. A gonadális szteroidok és az immunológiai kihívás interakciójának hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára

Az immunkihívás egyik "támadáspontja", a szaporodás fő szabályozó neuronja, a GnRH neuron, mely aktivitásának megváltoztatásán keresztül módosíthatja a reprodukció funkciókat (Karsch és mtsai, 2002; He és mtsai, 2003). Ezt a hatást immunfaktorok, például citokinek közvetíthetik a reprodukció működéseket szabályozó sejtek számára (Rivier és Vale, 1989; Rettori és mtsai, 1991; Bonavera és mtsai, 1993; Igaz és mtsai, 2006); ennek molekuláris mechanizmusa azonban nem tisztázott. A GnRH neuronban microarray tanulmánnyal több immunmediátor receptorának transzkriptumát azonosították (pl. TNF α , IL1, PGE $_2$ receptor) (Jasoni és mtsai, 2005). Mivel a célsejten az aktivált immunmediátor- például citokin receptorok egyik jelentős intracelluláris szignálja az ERK1/2 jelátviteli molekula foszforilációja (McCubrey és mtsai, 2000), ezért az immunkihívás hatással lehet az ERK1/2 foszforilációra a GnRH idegsejtekben. Továbbá ismert, hogy a gonadális szteroid ösztrogén befolyásolja az immunreakciók lezajlását, hatással van például a citokinek termelésére (Dimayuga és mtsai, 2005), ugyanakkor azt is tudjuk, hogy módosítja a jelátviteli útvonalakat a GnRH idegsejtekben (Ábrahám és mtsai, 2003). A GnRH neuronok működését befolyásoló immunstimulusok által aktivált jelátviteli folyamatok és azok ösztrogén-érzékenysége azonban nem ismert. Ezért a doktori értekezésem második részében azokat a kísérleteket mutatom be, melyekben az immunológiai kihívás, valamint az immunológiai kihívás és a gonadális szteroidok kölcsönhatásának ERK1/2 foszforilációra kifejtett hatását vizsgáltuk a GnRH neuronban.

3. CÉLKITŰZÉSEK

I. A **gonadális szteroidok ERK1/2 foszforiláció módosító hatásának** tanulmányozása egér agyban, különböző agyterületeken és egy-sejt szinten, a gonadotrop releasing hormon (GnRH) neuronokban *in vivo* ill., ezen változások **nemi dimorfizmusának** vizsgálata. Ezekhez a vizsgálatokhoz az alábbi kísérleti paradigmákat alkalmaztuk:

I.1.1. A gonadektómia ERK1/2 foszforilációra kifejtett hatását határoztuk meg nőstény és hím egerek egyes agyterületein és nőstény egerek GnRH idegsejtjeiben.

I.1.2. Az ösztrogén ERK1/2 foszforilációra kifejtett hatását vizsgáltuk a nőstény és hím egerek kiválasztott agyterületein ill., a GnRH neuronokban.

II. A következő kísérletsorozatban az **immunológiai kihívás** ERK1/2 útvonalra kifejtett hatását vizsgáltuk meg. Ehhez KLH-FITC-cel kiváltott T-sejt-függő humorális immunválaszt alkalmaztunk és annak **ERK1/2 foszforilációt** módosító hatását tanulmányoztuk a GnRH neuronokban és különböző agyi régiókban.

II.1. Az immunkihívás ERK1/2 foszforilációt okozó hatásának **mechanizmusát** az alábbiak lehetséges szerepének vizsgálatával próbáltuk feltárni:

II.1.1. T-sejtek

II.1.2. Proinflammatorikus citokinek

II.1.3. Proszttaglandinok

II.2. További kísérleteinkben megvizsgáltuk az immunkihívás által okozott ERK1/2 foszforiláció **szerepét** a HPG tengely szabályozásában.

III. Az utolsó kísérletsorozatban az **immunológiai kihívás és a gonadális szteroidok interakciójának** ERK1/2 foszforilációra kifejtett hatását kívántuk vizsgálni a GnRH neuronokban a következő kísérletek alapján:

III.1. Gonadektomizált egerekben tanulmányoztuk az immunkihívás hatását az ERK1/2 foszforilációra

III.2. 17 β -ösztradiollal kezelt egerekben határoztuk meg az immunkihívás moduláló hatását

4. ALKALMAZOTT ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket felnőtt, vad típusú nőtény és hím egereken (C57BL6/J; Országos Onkológiai Intézet) végeztük. A kísérlet során, illetve azt megelőzően az egereket 12:12 h sötét-világos fényciklusú szobákban tartottuk, ahol szabványos rágcslótáphoz és vízhez szabadon hozzáférhettek. A laboratóriumi állatok tartása, kezelése és a velük való bánásmód megfelelt a magyar (243/1998-as Állatvédelmi Törvény) és az európai (European Communities Council Directive, 86/609 EEC) előírásoknak.

4.1. A gonadális szteroidok hatása az ERK1/2 foszforilációra

4.1.1. A kísérleti állatok kezelése I.

4.1.1.1. Gonadektómia

2-3 hónapos C57BL6/J nőtény és hím egereket Avertinnel (5 g tribromoetanol, 3 ml amid-hidrá, 20 ml etanol, 230 ml 0,9% NaCl) elaltattunk, majd gonadektomizáltuk őket (GDX csoport: nőtény n=5, hím n=9), illetve álműtétet hajtottunk végre rajtuk (SHAM csoport: nőtény n=5, hím n=9). A műtét után két héttel az összes állatot túlaltattuk Avertinnel és transzkardiálisan perfundáltuk (4. A ábra).

4.1.1.2. 1 órás 17- β -ösztradiol kezelés

2-3 hónapos C57BL6/J nőtény és hím egereket Avertinnel elaltattunk, majd gonadektomizáltuk őket. A gonadektómiát követő 14. napon 0,1 ml etiloleát vivőanyagban oldott 1 μ g 17- β -ösztradiollal (E_2 ; Sigma; GDX+ E_2 1h csoport, n=6-6) vagy kizárólag vivőanyaggal (GDX+V 1 h csoport, n=6-6) kezeltük subcutan a nőtény és a hím egereket. 1 órával később valamennyi állatot túlaltattuk és perfundáltuk (4. B ábra). A csoportunkban korábban végzett kísérletek alapján tudjuk, hogy az ilyen módon adott ösztrogén 1 órával a kezelés után szignifikánsan növeli a nőtény egerek agyában az ERK1/2 foszforilációt és szintje a kezelést követően 4 óráig emelkedett marad (Ábrahám és mtsai, 2004).

4.1.1.3. Folyamatos 17- β -ösztradiol és progeszteron kezelés

Felnőtt, 6-8 hetes C57BL6/J nőtény egereket Avertin altatásban gonadektomizáltunk (GDX; n=12). Közülük 6 egér 1 μ g 17- β -ösztradiolt (E_2 ; Sigma; 0,1 ml etiloleát

4.I.1.4. Folyamatos 17- β -ösztradiol kezelés

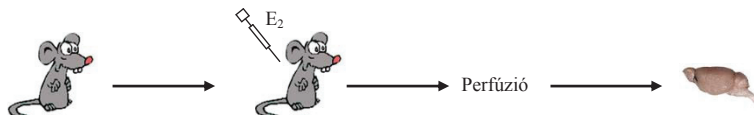
A) Gonadektómia

14. nap



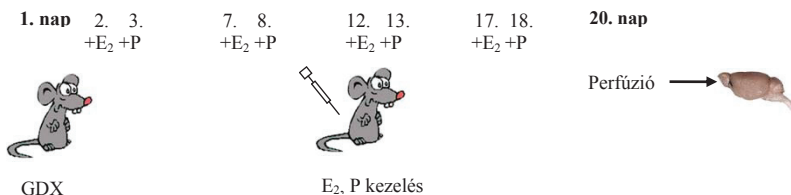
B) 1 órás 17- β -ösztradiol kezelés

14. nap

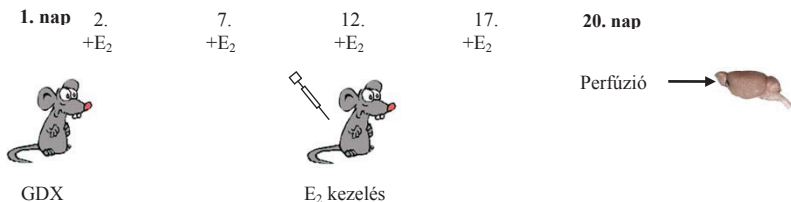


1 óra

C) Folyamatos 17- β -ösztadiol és progeszteron kezelés



D) Folyamatos 17- β -ösztadiol kezelés



4. ábra. A kísérleti állatok kezelésének folyamatábrája I. a gonadális szteroidok ERK1/2 foszforilációra gyakorolt hatásának vizsgálata során. (A: gonadektómia, B: 1 órás 17- β -ösztadiol kezelés, C: folyamatos 17- β -ösztadiol és progeszteron kezelés, valamint D: folyamatos 17- β -ösztadiol adás).

4.1.2. Transzkardiális perfúzió

Az állatokat a kísérletek végén Avertinnel túlaltattuk és perfundáltuk. A fixálás 20 ml 4°C-os 4%-os paraformaldehid (0,1 M-os foszfát pufferben, pH=7,6; Sigma) transzkardiális perfúziójával történt. A perfúzió előtt heparint tartalmazó fecskendővel 0,2 ml vért vettünk a jobb pitvarból a luteinizáló hormon (LH) ill., az ösztrogén szintjének meghatározásához, melyhez LH és 17- β -ösztadiol radioimmunoassay-t (RIA) használtunk. Az eltávolított agyakat 2 órán át posztfixáltuk 4°C-on, majd 30%-os 0,1 M-os Tris pufferben (TBS; Sigma) oldott szacharóz oldatba helyeztük 4°C-on egy éjszakára.

4.1.3. Szövettani módszerek I.

4.1.3.1. Metszés és szövettárolás

A perfúziót követő napon 4 sorozat 30 μ m vastagságú coronalis síkú metszeteket készítettünk szánkamikrotómmal. Metszés után a szöveteket fagyálló folyadékban tároltuk -20°C-on a szövettani feldolgozásig. A fagyálló folyadék összetétele az alábbi volt: 0,79 g NaH₂PO₄ x H₂O, 6,8 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 300 ml etilén-glikol, 200 ml glicerin, 500 ml desztillált víz.

4.1.4. Kvantitatív immunhisztokémia

4.1.4.1. Peroxidázzal jelölt ERK és pERK1/2 immuncitokémia

Az ERK, ill. a foszforilált ERK1/2 (pERK1/2) immuncitokémiai festésre 1-1 sorozat metszetet használtunk. A kezelésből adódó különbségek csökkentése érdekében a kezelt és a kontroll metszeteket minden esetben együtt inkubáltuk. A fagyálló folyadék kimosása és az inkubációk közötti mosások 0,05 M-os Tris pufferben szabadon úszó metszeteken történtek (3x10 perc). A szöveti endogén peroxidázok kimerítésére, valamint a szövetek további fixálására 1 %-os H_2O_2 , 40 %-os metanolos kezelést alkalmaztunk 15 percig a primer ellenanyag előtt. Elsődleges antitestként a patkány ERK2 fehérje C terminálisa ellen egérben termelt poliklonális ellenanyagot (pan ERK, 1:2000, BD Transduction Laboratories) használtunk. A metszetek másik részét a patkány ERK1 fehérjéjének egy szekvenciája ellen nyúlban kifejlesztett poliklonális antiszérumban (pERK1/2, Thr202/Tyr204, 1:1000, Cell Signaling) inkubáltuk. A primer ellenanyagokat 4°C-on 2 napig hagytuk a metszeteken. A pERK1/2 antitest az extracelluláris szignál regulált kinázok 42 és 44 kDa-os izotípusát ismeri fel (ERK1/2), míg a pan ERK antiszérum ezen kívül az extracelluláris szignál regulált kinázok családjának egy 56 és egy 85 kDa-os tagját is felismeri. A nem specifikus fehérjekötés blokkolására valamennyi szérumhígító 0,25 % borjú szérum albumint (BSA), ill. a penetráció növelése érdekében 0,3 % Triton-X 100-at tartalmazott. A primer ellenanyagokat követően kecskében temelt biotin-konjugált anti-egér, ill. anti-nyúl antitestben (1:200, Vector) inkubáltuk a metszeteket szobahőn 2 órán keresztül. Majd harmadlagos immunreagensként biotin-avidin-tormaperoxidáz komplexet (1:500, Vector) alkalmaztunk, ugyancsak szobahőmérsékleten 2 órán át. A peroxidázzal jelölt antigén-ellenanyag láncot az enzim szubsztrátumával történő inkubáció során kicsapódó kromogénnel, nikkel-diaminobenzidin tetrahidrokloriddal (NiDAB) jelöltük. A reakció lassítása végett az enzim szubsztrátját, a H_2O_2 -ot glükóz jelenlétében glükóz oxidázzal állítottuk elő. Az előhívás után a metszeteket zselatinos tárgylemezre húztuk fel, felszálló alkoholsorban dehidráltuk és Depex fedőanyaggal fedtük le. Az ellenanyagok specifikusságát rágcslókban, köztük egérben több tudományos munkában is leírták (Ábrahám és mtsai, 2004; Li és mtsai, 2001; Crosio és mtsai, 2003), ezenkívül mi is ellenőriztük, hogy a primer ellenanyag kihagyásával történő festés nem ad jelet.

4.I.4.2. Kvantitatív képelemzés

Az ERK és a pERK1/2 immunoreaktív sejtek elemzéséhez Olympus BX-51 mikroszkópra szerelt Olympus F-View kamerával digitalizáltuk az anyagot. A kiértékeléshez az AnalySIS képalkotó programot (Soft Imaging System GmbH, Németország) használtuk. A metszetek analízise vakon történt, nem tudtuk melyik a kezelt és a kontroll csoport. Az általunk készített ERK expressziós mintázati térkép (1. táblázat), öt agyi régiót választottunk ki a kvantitatív vizsgálathoz: a medialis preopticus areát (mPOA), az anteroventralis periventricularis magot (AVPV), a bed nucleus striae terminalis ovális almagját (BNST), a piriformis (Pir) és a cingularis cortexet (Cg).

Minden állat esetében 2-2 azonos síkú metszetet elemeztünk agyi régióinként mindkét oldalon. Ezek átlagából képeztünk egy értéket, és a továbbiakban ezzel jellemeztük az adott állatot. Az anatómiai struktúrákat, ill. azok síkját a Franklin és Paxinos egér agy atlasz alapján azonosítottuk (Paxinos és Franklin, 2001). A pERK1/2 immunjelölt sejteket 10x-es nagyításon elemeztük. Az immunjelölt sejtek számának meghatározásához a következő méretű téglalapot helyeztük az egyes agyi területekre és az alábbi síkokat választottuk az elemzéshez: mPOA, 0,205 mm², 29-es lap; AVPV, 0,009 mm², 28-as lap; BNST, 0,122 mm², 30-as lap; Pir, 0,322 mm², 38-as lap; Cg, 0,195 mm², 26-os lap. Az ERK immuncitokémia esetében a citoplazmatikus festődést mutató sejtek nagy számú átfedése miatt a sejtszámolás helyett optikai denzitást (O.D.) mértünk a kísérleti csoportok közötti kvantitatív különbségek becslésére. Ehhez az NIH Image szoftvert (NIH Image, Bethesda, USA) használtuk. Az O.D. értékeket a 2-2 elemzett metszet O.D. értékének átlagolásával kaptuk meg a háttér kivonása és a szűrkeármánylatos kontraszt adatok küszöbértékének megállapítása után. Ebben az esetben 20x-os nagyítást használtunk az elemzésnél.

4.I.5. Egy-sejt szintű vizsgálatok

4.I.5.1. Fluoreszcens immuncitokémia

4.I.5.1.1. ERK és GnRH kettős immuncitokémiai festés

A fagyálló oldat 0,05 M-os Tris-ben történő kimosása után egérben termelt poliklonális patkány pan ERK (1:1000, BD Transduction Laboratories) antiszérumban és birkában termelt poliklonális GnRH antitestben (1:10000, Alain Caraty ajándéka, Franciaország) inkubáltuk a metszeteket 2 napig 4°C-on. Ezt követően számarban termelt anti-egér Cy5-jelölt ellenanyagban (1:200, 2 óra, Jackson), majd számarban kifejlesztett biotinilált anti-

birka immunoglobulinban (1:200, 2 óra, Jackson) és végül avidin-Alexa Fluor 488-ban (1:1000, 2 óra, Molecular Probes) inkubáltuk a metszeteket. A metszeteket Superfrost tárgylemezre húztuk fel és fluoreszcens fedőanyaggal, Mowiolal fedtük le.

4.I.5.1.2. pERK1/2 és GnRH kettős immuncitokémiai festés

A metszeteket a fentieknek megfelelően kezeltük, azzal a különbséggel, hogy a GnRH ellenanyag mellett primer antitestként nyúlban termelt poliklonális patkány pERK1/2 (1:500, Cell Signaling) ellenanyagot alkalmaztunk, és ehhez számban termelt anti-nyúl Cy5-jelölt ellenanyagot kötöttünk.

4.I.5.1.3. Kvantitatív képelemzés

A metszeteket multi Argon lézerrel és Helium Neon lézerekkel felszerelt Olympus Fluoview FV500-as konfokális lézer szkennning mikroszkóppal analizáltuk. Az Alexa 488 fluoreszcens festék gerjesztéséhez a multi Argon lézer 488 nm hullámhosszú lézersugarát (zöld lézer), míg a Cy5 fluoreszcens jelölőanyag gerjesztéséhez a Helium Neon lézer 649 nm excitációs hullámhosszát (piros lézer) használtuk. A GnRH dekapeptid és az ERK ill., a pERK1/2 jelátviteli molekula kolokalizációját 60x nagyításon, 512 x 512 felbontáson vizsgáltuk. Az alkalmazott fluoreszcens festékek esetleges áthallásának elkerülésére szekvenciális szkennelést használtunk. A sejtek precízebb és megbízhatóbb értékelése érdekében a GnRH neuronok több síkját is megvizsgáltuk.

4.I.6. Hormonmérés

Az egerektől nyert vérből a plazmát centrifugálással (3000 rpm, 30 perc, 4°C) elválasztottuk, majd -20°C-on tároltuk az analízisig.

4.I.6.1. Luteinizáló hormon (LH) RIA

A plazma luteinizáló hormon (LH) koncentrációját radioimmunoassay (RIA) segítségével határoztuk meg, ami az USA Nemzeti Hipofízis programjából származott. A mérés érzékenysége 0,16 ng/ml, a mérésen belüli variancia 5,6 % volt. Minden minta esetében két párhuzamos mérés történt, és az így kapott két mérési eredmény számtani közepét tekintettük az adott minta LH értékének.

4.I.6.2. 17- β -ösztadiol RIA

A plazma 17- β -ösztadiol koncentrációját szintén radioimmunoassay (RIA) segítségével határoztuk meg, melyhez ultraszenzitív ösztadiol kitet (DSL 4800, Diagnostic System Laboratories, Inc.) használtunk. Ellenanyagként poliklonális nyúl anti-ösztadiol szérumot, jelölőanyagként pedig ^{125}I -dal jelölt ösztadiolt alkalmaztunk. A mérés érzékenysége 2,2 pg/ml volt.

4.II. Az immunológiai kihívás hatása az ERK1/2 foszforilációra

4.II.1. A kísérleti állatok kezelése II.

4.II.1.1. KLH-FITC oltás

6 hetes C57BL6/J intakt nőstény egereket szubkután, faroktőbe 200 μg KLH-FITC-cel oltottunk ($n=5-5$). Az oltóanyag 200 μl 1 mg/ml KLH-FITC-et (KLH: Sigma, FITC: Molecular Probes), 50 μl steril PBS-t és az antigén immunogenitásának fokozásához 250 μl komplett Freund adjuvánt (CFA; Sigma) tartalmazott. A kontroll csoportot 500 μl PBS-sel kezeltük ($n=5-5$). A KLH-FITC-indukált ERK1/2 foszforiláció időfüggésének megállapításához az immunizálás után különböző időpontokban, 6 órával, 3, 6 és 12 nappal 4% paraformaldehiddel transzkardiálisan perfundáltuk az egereket a fentebb leírt módon.

4.II.1.2. CFA oltás

6 hetes C57BL6/J intakt nőstény egerek faroktővébe 250 μl steril PBS-ben oldott 250 μl komplett Freund adjuvánt oltottunk ($n=5$). A kontroll egerek 500 μl PBS-t kaptak ($n=5$). A perfúzió a kezelést követő 6. napon történt.

4.II.1.3. Dextrán-FITC oltás

Az oltáshoz 6 hetes C57BL6/J intakt nőstény egereket használtunk. A kezelt csoport 200 μl 1 mg/ml PBS-ben oldott dextrán-FITC-et (Fluka BioChemika) kapott intraperitoneálisan ($n=5$), a kontroll csoportot pedig 200 μl PBS-sel „oltottuk”. A dextrán-FITC hatását ebben az esetben is az oltás utáni 6. napon elemeztük.

4.II.1.4. Indomethacin kezelés

A kezelés során 6 hetes C57BL6/J nőstény egereket KLH-FITC-cel immunizáltunk ($n=10$). Az egerek felének az oltás előtt fél órával ill., az immunizálás utáni 6. napig minden nap 5 mg/kg Indomethacint (Fluka, Sigma) adtunk intraperitoneálisan. A kontroll csoport az

Indomethacin kezeléssel azonos időpontokban az Indomethacin oldószerét (2,5% etanol, 0,9% NaCl) kapta.

4.II.2. Szövetvettani módszerek II.

A kísérleti állatok perfúziója, az agy metszése a korábban leírtaknak megfelelően történt, azzal a különbséggel, hogy a perfúzió előtt heparint nem tartalmazó fecskendővel vettünk vért az egerektől a vérben lévő immunglobulinszintek meghatározásához (ld. ELISA), valamint az egerek lépét is eltávolítottuk az immunglobulin termelő plazmasejtek számának meghatározásához (ELISPOT). Az immuncitokémiai festések és azok kiértékelése szintén a korábbiakban leírtak alapján történt. Azzal a különbséggel, hogy két további agyterületet is elemeztünk, a motoros cortexet (M1-2) és a paraventricularis magot (PVN), melyekre az alábbi méretű téglalapot helyeztük és a következő síkokat analizáltuk a Paxinos egér agy atlasz alapján: M1-2, 0,322 mm², 25-ös lap; PVN, 0,122 mm², 38-as lap.

4.II.3. Western blot

A Western blot analízis során KLH-FITC-cel immunizált és kontroll 6 hetes C57BL/6/J nőstény egerek egyes agyterületeit hasonlítottuk össze (n=3-3). Az immunizálás után 6 nappal dekapitáltuk az egereket, majd a koponyacsont eltávolítása után a következő agyterületeket vágtuk ki szárazjégen: hypothalamus (HT), septum (S), striatum (ST), thalamus (T), cortex (C) és hippocampus (H). Az agyszöveteket feldolgozásig -80°C-on tároltuk. A feldolgozás során 1 µg/ml koncentrációban enzimgátlókat (leupeptin, pepstatin A, fenilmetánszulfonil fluorid (PMSF), aprotinin, vanadát) tartalmazó 0,32 M-os jégbehűtött szacharóz oldatban (20 µl homogenizáló puffer/ 1 mg agyszövet) homogenizáltuk az agyszöveteket. A citoplazma frakciót tartalmazó felülúszót centrifugálással (3000 rpm, 10 perc, 4°C) nyertük. A fehérje koncentrációt bicinchoninic acid (BCA) fehérjemérő kit segítségével határoztuk meg. A mintákat 2x Laemmli pufferben (0,125 M Tris HCl, 4% SDS, 20% glicerin, 2% 2-merkaptóetanol, pH 6,8) vettük fel. Minden mintából azonos protein mennyiséget (30 µg) választottunk el 7,5%-os poliakrilamid gélen SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (PAGE). A fehérje sávokat nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories) vittük át elektromosan. A membránokat 5% nem zsíros tejport tartalmazó TBS-Tweenben (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 132,5 mM NaCl, 0,05% Tween-20) blokkoltuk szobahőn 1 órán át, majd TBS-Tweenben hígított anti-nyúl pERK1/2 ellenanyagban (1:1000, Cell Signaling), valamint a szeparált

fehérjemennyiség ellenőrzésére nyúlban termelt patkány (1:500, Sigma) ellenanyagban inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül. Ezután blokkoló oldatban hígított HRP-konjugált poliklonális kecskében temelt anti-nyúl ellenanyagban (1:2000, Dako Cytomation) inkubáltuk a membránokat szobahőmérsékleten 1 óráig, majd kemilumineszcenciás szubsztrát (SuperSignal West Pico, Pierce Biotechnology) segítségével hívtuk elő a jelet. Az inkubációs lépések között TBS-Tweenel mostuk a membránokat.

4.II.4. Limfocita izolálás

KLH-FITC-cel immunizált ill., PBS-sel kezelt 8 hetes C57BL/6/J nőstény egereket ($\Sigma n=8-8$) 6 nap után fiziológiás sóoldattal perfundáltunk. A perfúzió után a két kísérleti csoport egyedeinek agyát eltávolítottuk a koponyacsontból ($n=4-4$) és HBSS pufferben (pH 7,4, 5,4 mM KCl, 137 mM NaCl, 0,3 mM Na_2HPO_4 , 0,4 mM KH_2PO_4 , 4,2 mM NaHCO_3 , 1,3 mM CaCl_2 , 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,6 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 5,6 mM D-glükóz) egyenként homogenizáltuk. Ezután 1200 rpm sebességgel, 10 percig 4°C-on centrifugáltuk a mintákat. A felülszós eltávolítása után 5-5 ml 1mg/ml kollagenázt (Sigma) és 0,1 mg/ml DN-áz 1-et (Sigma) tartalmazó HBSS pufferben vettük fel újra a pelletet, majd 1 óráig 37°C-on inkubáltuk a szuszpenziót. Ezt követően a sejtek aggregációjának elkerülésére mindegyik mintához EDTA-t adtunk 20 mM végkoncentrációban 5 percig, majd 70 μm -es szűrőn átszűrtük a homogenizátumot. Újabb centrifugálás (1200 rpm, 10 perc, 4°C) után 7 ml 30%-os Percollban (Sigma) újra szuszpendáltuk a pelletet, amit óvatosan rárejtegettünk 4 ml 70%-os Percollra. (A 30 és a 70%-os Percoll 90%-os Percoll hígításával készül, mely a tömény Percoll és a 10xPBS 9:1 arányú keveréke.) Ezután 2000 rpm sebességgel, 10 percig 4°C-on centrifugáltuk a mintákat, majd a 30 és a 70%-os Percoll határán kapott sejtfrakciókat összegyűjtöttük. Az egy kísérleti csoporthoz tartozó mintákat ennél a lépésnél egyesítettük. Ezután még kétszer mostuk HBSS pufferrel a sejtfrakciót, majd tripán kék festés után Bürker kamrában megszámoltuk a sejteket.

4.II.5. Az agyból izolált sejtek citofluorimetriás mérése

Az agyból izolált sejteket ($\sim 2 \times 10^5$) FACS pufferrel (0,5% FCS-t és 0,1% Na-azidot tartalmazó PBS) mostuk, majd 5 percig egérben termelt K9.361 anti-egér FcgammaRII ellenanyaggal (az ELTE Immunológia Tanszékén gyártott antitest) blokkoltuk az Fc receptorokat jégen. Ezután a B-sejtek festéséhez FITC-cel jelölt patkányban termelt anti-egér B220 markerrel (az ELTE Immunológia Tanszékén gyártott antitest), a T-sejtek

azonosításához pedig Alexa-647-tel jelölt hörcsögben termelt anti-egér monoklonális CD3 ellenanyaggal (Caltag) inkubáltuk a sejteket 30 percig 4°C-on. FACS pufferral történő mosás után áramlási citofluoriméterrel (FACSCalibur, Becton Dickinson) sejtfelszíni markereik segítségével mértük a limfocitákat. Az elemzés során az agyban található limfocitapopulációt a lép limfociták előre- és oldalra irányuló fényszórás értékei alapján állapítottuk meg. Az előre irányuló fényszórás (FSC-forward scatter) a sejtek méretével és alakjával arányos, az oldalra irányuló fényszórás (SSC-side scatter) pedig a sejtek granuláltságával, optikai sűrűségével. A fluoreszcensen jelölt sejteket CellQuest Pro (Becton Dickinson) programmal elemeztük. Az analízis során a kiválasztott limfocitapopuláción belüli CD3⁺ T-sejtek százalékos arányát határoztuk meg.

4.II.6. Citokin ELISA

KLH-FITC-cel immunizált és nem immunizált (PBS-sel injektált) egereket (n=3-3) jégbehűtött fiziológiás sóoldattal perfundáltunk, majd az agyukat kivettük a koponyából. Az agyból egy kb. 5mm vastag, a hypothalamust és a medialis septumot magában foglaló blokkot vágunk ki, amit szárazjégen azonnal lefagyasztottunk és hozzáadtuk a 0,1% Tween-20-at és proteáz gátlókat (1 µg/ml leupeptin, pepstatin A, PMSF, aprotinin, vanadát) tartalmazó jégbehűtött PBS puffert (pH=7,4), amiben homogenizáltuk az agymintát (250 µl homogenizáló puffer/ 50 mg agyszövet). Ezután 30 percig hagytuk jégen állni a mintákat, majd 10 000 rpm sebességgel, 10 percig 4°C-on centrifugáltuk. A felülzót alikvótokban -80°C-on tároltuk a citokin fehérje mennyiség meghatározásáig. Az IL-1β és TNF-α fehérje koncentrációt kvantitatív szendvics ELISA segítségével a megadott leírás szerint mértük (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). A minták fehérje mennyiségeit a megfelelő standard görbéhez hasonlítva állapítottuk meg és 100 mg agyszövetre vonatkoztatva adtuk meg.

4.III. A gonadális szteroidok és az immunstressz interakciójának hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára

4.III.1. A kísérleti állatok kezelése III.

4.III.1.1. Gonadektómia és KLH-FITC oltás

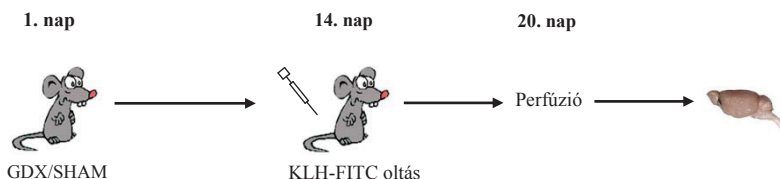
6-8 hetes vad típusú (C57BL6/J) nőstény egereket Avertinnel elaltattunk, majd gonadektomizáltuk őket (GDX; n=12) vagy álműtétet hajtottunk végre rajtuk (SHAM; n=12). Két héttel később mindkét csoportból 6-6 egeret KLH-FITC-cel immunizáltunk

(GDX+I, SHAM+I), a másik 6-6 egeret pedig PBS-sel kezeltük (GDX és SHAM csoport; 5. A ábra). Az immunizálás utáni 6. napon valamennyi állatot transzkardiálisan perfundáltuk (ld. 37. oldal, 4.I.2).

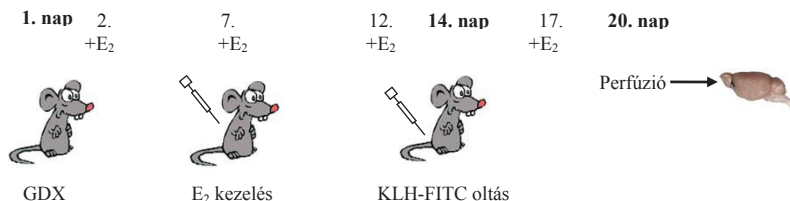
4.III.1.2. 17- β -ösztradiol kezelés és KLH-FITC oltás

Felnőtt, 6-8 hetes C57BL/6/J nőstény egereket Avertinnel elaltattunk, majd gonadektomizáltuk őket. (GDX; n=28). 14 egeret 1 μ g 17- β -ösztradiollal (E₂; Sigma; 0.1 ml etiloleát vivőanyagban oldva, subcutan.; E₂) kezeltünk, a másik 14 egér csak vivőanyagot kapott (V) a műtét utáni 2., 7., 12. és 17. napon. Két héttel később 7 egeret az ösztrogénnel és 7 egeret a vivőanyaggal kezelt csoportból KLH-FITC-cel immunizáltunk (E₂+I; V+I; 5. B ábra). Az összes kísérleti állatot az oltás után 6 nappal elaltattuk és perfundáltuk.

A) Gonadektómia és KLH-FITC oltás



B) 17- β -ösztradiol kezelés és KLH-FITC oltás



5. ábra. A kísérleti állatok kezelésének folyamatábrája II. a gonadális szteroidok (A: gonadektómia, B: 17- β -ösztradiol) és az immunológiai kihívás interakciójának a GnRH idegsejtek ERK1/2 foszforilációjára gyakorolt hatásának vizsgálata során.

4.III.2. Ösztrusz ciklus és LH szint meghatározás

8 hetes C57BL6/J intakt nőtény egereket KLH-FITC-cel oltottunk (n=5-5). Az ösztrusz ciklus esetleges változásának meghatározásához oltás előtt és után két héttel minden nap vaginális kenetet vettünk az egerektől, majd toluidin kékkel megfestettük a keneteket és az ösztrusz ciklus három fázisát különböztettük meg (proösztrusz, ösztrusz, diösztrusz). Az LH szint méréséhez (ld. LH RIA) az oltás után 6 órával, 3, 6 és 12 nappal vért vettünk a szemzúgából.

4.III.3. Szövettani módszerek III.

Ezen kísérleti állatok szövettani feldolgozása ugyanúgy történt, mint az eddig leírt kísérletekben. A perfúzió előtt azonban, heparinos és nem heparinos fecskendővel is vettünk vért az egerektől a vérben lévő 17- β -ösztradiol szint (ld. 17- β -ösztradiol RIA) ill., az immunglobulinszintek meghatározásához (ld. ELISA). Az egerek lépét most is eltávolítottuk az immunglobulin termelő plazmasejtek számának meghatározásához (ELISPOT). A metszeteket fluoreszcensen festettük a már bemutatott protokoll szerint (ld. 39. oldal, 4.I.5.1).

4.2. Ellenanyagszint és ellenanyagtermelő plazmasejt szám mérés

Az immunizálások hatékonyságát minden esetben IgM és IgG ellenanyagszint mérésekkel (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA), valamint az IgM és IgG termelő plazmasejtek számának mérésével (enzyme-linked immunosorbent spot-ELISPOT) igazoltuk. Az ELISPOT eredményeit nem mutatom be, ezért a módszer leírása sem szerepel a dolgozatban.

4.2.1. ELISA

A kísérleti állatok perfúziója előtt kb. 0,2 ml vért vettünk a jobb pitvarból a FITC ellen termelt ellenanyagszintek meghatározásához. Az így nyert vért 4°C-on hagytuk állni, majd másnap centrifugálással (3000 rpm, 15 perc, 4°C) választottuk el a szérumot a méréshez. A vérszérumot alikvótokban, -80°C-on tároltuk a felhasználásig.

A lemezekre (Costar no. 9018, Corning) PBS-ben hígított 10 μ g/ml BSA-FITC-et kötöttünk ki egy éjszakán át, 4°C-on. A nem specifikus kötőhelyek blokkolására 0,05% Tween20-PBS-ben oldott 1% nem zsíros tejporban inkubáltuk a lemezeket szobahőmérsékleten 2 óráig.

A szérummintákat 1:50-es kezdeti hígításban vittük fel a lemezekre, majd harmadoló hígítással hígítási sort készítettünk. Minden minta esetében három párhuzamos mérést végeztünk. Szobahőmérsékleten történő 1 órás inkubáció után kecskében termelt HRP-konjugált poliklonális anti-egér IgM és IgG ellenanyagot (1:2000, Dako Cytomation) adtunk a szérumot tartalmazó lyukakhoz. Ezután a HRP enzim szubsztrátjával, H_2O_2 -dal és 3,30,5,50-tetrametil benzidinnel (TMB) (Dako) inkubáltuk a lemezeket. A színreakciót 50 μl 2N H_2SO_4 hozzáadásával állítottuk le. Az abszorbanciát 450 nm hullámhosszon mértük mikrolemez leolvasóval (Sanofi Pasteur, Diagnostics, PR 2100). Az abszorbancia értékeket a 650 nm-en mért háttér abszorbancia levonása után és a három párhuzamos mérés átlagaként kaptuk meg. Az egyes inkubációs lépések között PBS-Tweennel mostuk a lemezeket.

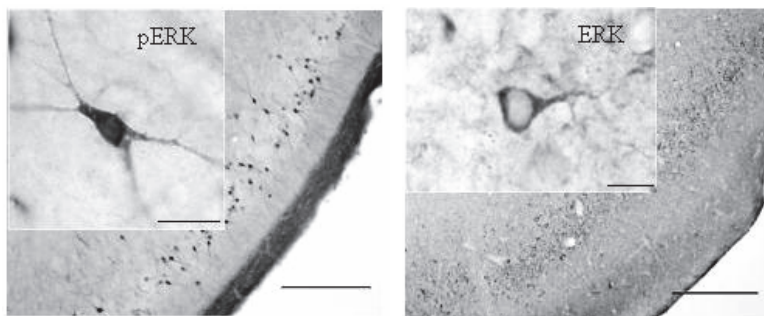
4.3. Statisztikai módszerek

Az eredményeket az átlag \pm SEM feltüntetésével ábrázoltuk. A statisztikai szignifikancia meghatározásához a STATISTICA 7.0 programot (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) használtuk. A kísérleti csoportok közötti különbségek meghatározására négy kísérleti csoport esetén két utas ANOVA-t és Tukey's post hoc tesztet, két csoport esetén Mann Whitney U tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia határát $p < 0,05$ -nél húztuk meg, és ezt a diagram megfelelő oszlopában csillaggal ábrázoltuk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A gonadális szteroidok hatása az ERK1/2 foszforilációra

5.1.1. Az ERK1/2 foszforiláció kvalitatív és kvantitatív meghatározása



6. ábra. A pERK1/2 és az ERK lokalizációja a sejtekben. A képek pERK1/2 és ERK immunreaktív sejteket mutatnak a piriformis cortexben. ERK immunreaktivitás kizárólag a citoplazmában és a rostokban mutatható ki, míg pERK1/2 expresszió a magban is detektálható. A lépték a kis nagyítású képeken 200 μ m, a nagy nagyításúakon 10 μ m.

1. táblázat. Az ERK és a pERK1/2 fehérje eloszlása egér agyban

Terület	♀/♂ ERK	♀/♂ pERK
<i>Isocortex</i>		
Infralimbicus	+++	++
Prelimbicus	+++	++
Cingularis	+++	++/+
<i>Area olfactoria</i>		
Nucl. olfactorius anterior	+++	-
Piriformis cortex	+++	+++//++
<i>Corpus striatum</i>		
Striatum		
Caudatoputamen	+++	-
Nucl. accumbens	+++	-
Pallidum	-	-
<i>Area septalis</i>		
Septum lateralis	++	++
Septum medialis	+	+-
Bed nucl. striae terminalis (subnucl. ovalis)	+++	+++//++

Terület	♀/♂ ERK	♀/♂ pERK
<i>Organi circumventricularia</i>		
Nucl. anteroventralis periventricularis	+++	++/+++
Organum subfornicalis	+++	++
Eminentia mediana	+++	++
<i>Thalamus</i>		
Anterior	+++	-
Medialis	+++	-
Ventralis	+++	-
<i>Hypothalamus</i>		
Nucl. suprahypophysialis	++	+/-
Nucl. preopticus medialis	+++	+/-
Nucl. supraopticus	+++	+++
Nucl. paraventricularis	+++	+++
Parvocellularis	++	++
Magnocellularis	+++	+++
Nucl. arcuatus	++	++
Medialis preopticus area	+++	+++/>++
Regio subparaventricularis	++	+
Nucl. hypoth. anterior	++	+
Nucl. ventromedialis	+++	++
Nucl. dorsomedialis	+++	++
Regio tuberomammillaris	++	++
<i>Amygdala</i>		
Nucl. Medialis	++	++
Nucl. Centralis	++	+++
Nucl. Lateralis	+	+/-
Nucl. Basolateralis	+++	+/-
<i>Hippocampus</i>		
CA1/CA2/CA3/CA4	+++	+
Gyrus dentatus	+++	+
<i>Truncus cerebri</i>		
Substantia grisea centralis	+++	++
Nucl. parabrachialis	+++	++
Nucl. raphe	+++	++
Locus coeruleus	+++	++
Ventralis tegmentalis area	++	+

A hím és nőtény SHAM egerek agyterületeinek vizsgálatával készített kvalitatív expressziós térkép alapján megállapíthatjuk, hogy az ERK szinte valamennyi agyterületen magas expressziós szinttel jellemezhető, míg a pERK1/2 expressziós szintje igen eltérő agyi területenként, és nemek közti különbségeket is mutat. A kvalitatív elemzés alapján öt agyi régió esetében láttunk különbséget a hímek és a nőtények között: a medialis preopticus terület (mPOA), az anteroventralis periventricularis mag (AVPV), a bed nucleus striae terminalis ovális almagja (BNST), a piriformis (Pir) és a cingularis cortex (Cg) esetében. Így a továbbiakban ezeken a területeken vizsgáltuk meg a pERK1/2 expresszió szintjében történő változásokat gonadektómia és ösztrogén kezelés hatására pontosabb, kvantitatív elemzéssel. Azokat a nemi különbségeket, melyeket a kvalitatív elemzés alapján láttunk az alábbi táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat. A kvalitatív térképezés alapján a pERK1/2 fehérje szintjében nemi különbséget mutató agyi területek

Terület	♀ pERK	♂ pERK
Medialis preopticus area	+++	++
Nucl. anteroventralis periventricularis	++	+++
Bed nucl. striae terminalis (subnucl. ovalis)	+++	++
Cingularis cortex	++	+
Piriformis cortex	+++	++

5.1.1.1. A gonadektómia hatása az ERK1/2 foszforilációra nőtény és hím egerekben

Az endogén gonadális szteroid szint szexuálisan dimorf hatását az ERK expresszióra, ill. foszforilációra intakt nőtény és hím, valamint gonadektomizált (GDX) nőtény és hím egerek agyi területein, az ERK immunpozitív sejtek optikai denzitásának és a pERK1/2 immunpozitív sejtek számának összehasonlításával vizsgáltuk.

A kvantitatív analízis szerint a gonadektómia nem módosította az ERK immunreaktivitás intenzitását egyik általunk vizsgált területen sem és nem mutatott nemi különbségeket (3. táblázat).

Nőstény egerekben a gonadektómia szignifikánsan növelte ($p<0.05$) az AVPV-ben a pERK1/2 pozitív sejtek számát (7. A ábra), míg hímekben a piriformis cortexben csökkentette az ERK1/2 foszforilációt (7. A, B ábra). A többi analizált agyi régióban nem láttunk változást (7. A ábra). Az adataink azt is mutatják, hogy a pERK1/2 immunreaktív sejtek száma az AVPV-ben szignifikánsan nagyobb a GDX és az intakt hím egerekben a GDX és intakt nőstényekkel összehasonlítva. ($p<0.05$) (7. A ábra).

A kísérleti csoportok megbízhatóságát LH szint mérésel igazoltuk: az LH szint szignifikánsan magasabb volt a GDX egerekben, mint az álműtött (SHAM) állatokban. (SHAM nőstény: 2.11 ± 0.14 ng/ml, GDX nőstény: $7.24\pm0.1^*$ ng/ml, SHAM hím: 2.99 ± 0.1 ng/ml, GDX hím: $8.08\pm0.24^*$ ng/ml; $^* = p<0.05$).

5.1.1.2. Az ösztrogén hatása az ERK1/2 foszforilációra gonadektomizált nőstény és hím egerekben

Az ösztrogén szexuálisan dimorf hatását az ERK fehérje expressziójára, ill. foszforilációjára intakt nőstény és hím, valamint gonadektomizált nőstény és hím egerek agyterületein, ugyancsak az ERK immunpozitív sejtek optikai denzitásának és a pERK1/2 immunpozitív sejtek számának összehasonlításával vizsgáltuk.

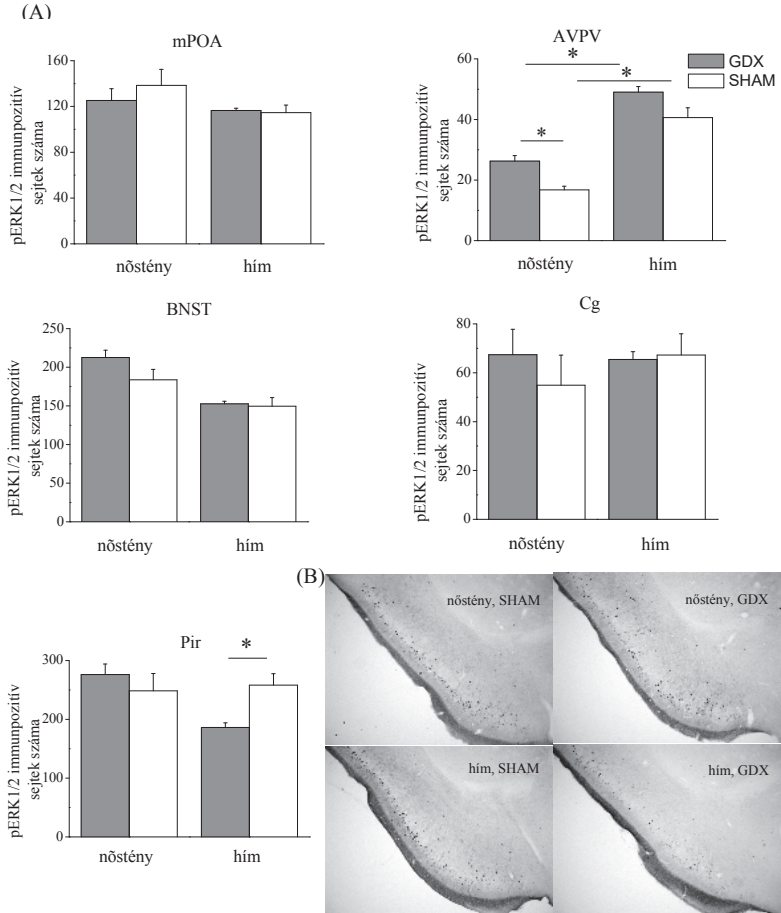
Az ösztrogén kezelés az ERK immunreaktív sejtek optikai denzitását nem módosította és nemi differenciát sem mutatott egyik elemzett területen sem (3. táblázat).

A GDX nőstény egerekben az ösztrogén adás szignifikánsan növelte ($p<0.05$) a pERK1/2 immunpozitív neuronok számát a mPOA-ban (8. A, B ábra) és az AVPV-ben (8. A ábra), míg a Pir-ben, a BNST-ben és a Cg-ben nem mutatott különbséget (8. A ábra). A gonadektomizált hím egerekben az ösztrogén kezelésnek nem volt szignifikáns hatása az ERK1/2 foszforilációra egyik vizsgált területen sem (8. A ábra).

Ezenkívül eredményeink ebben a kísérletben is azt mutatták, hogy az AVPV-ben a pERK1/2 immunreaktív sejtek száma különbözik a két nemben. A vivőanyaggal kezelt csoportban ugyanis az AVPV-ben a pERK1/2-t kifejező sejtek száma hímekben szignifikánsan nagyobb volt ($p<0.05$), mint nőstény egerekben (8. A ábra).

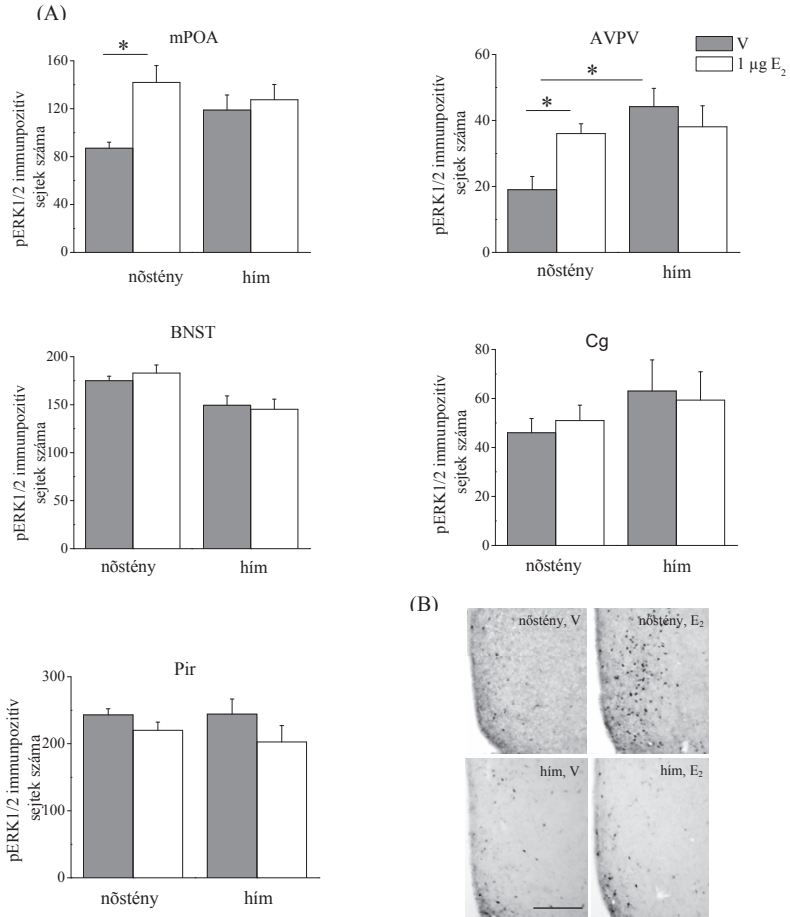
Az ösztrogén kezelés hatékonyságát szintén LH szint mérésel bizonyítottuk: az ösztrogén hatékonyan csökkentette a plazma LH szintjét a GDX nőstényekben és hímekben egyaránt (GDX nőstény: 8.3 ± 1.9 ng/ml, GDX nőstény+E₂: $2.8\pm0.5^*$ ng/ml, GDX hím: 7.3 ± 0.27 ng/ml, GDX hím+E₂: $3.01\pm0.11^*$ ng/ml; $^* = p<0.05$).

A gonadektómia hatása az ERK1/2 foszforilációra



7. ábra. A gonadektómia hatása az ERK1/2 foszforilációra nőstény és hím egerek agyában. A: A diagramok a pERK1/2 immunreaktív sejtek számának átlagát (\pm SEM) mutatják adott területre vonatkoztatva a medialis preopticus areában (mPOA), az anteroventralis periventricularis magban (AVPV), a bed nucleus striae terminalis ovális almagjában (BNST), a piriformis (Pir) és a cingularis cortexben (Cg) gonadektomizált (GDX) és álműtött (SHAM) nőstény és hím egerekben. $*p < 0.05$, $n = 5-9$ /csoport. B: A felvételek a pERK1/2 immunreaktivitás változásait mutatják a nőstény és a hím egerek Pir-ében gonadektómiát, ill. álműtétet követően. A lépték 200 μ m.

Az ösztrogén hatása az ERK1/2 foszforilációra



8. ábra. Az ösztrogén hatása az ERK1/2 foszforilációra nőstény és hím egerek agyában. A: A diagramok a pERK1/2 immunreaktív sejtek számának átlagát (\pm SEM) mutatják adott területre vonatkoztatva a medialis preopticus areában (mPOA), az anteroventralis periventricularis magban (AVPV), a bed nucleus striae terminalis ovális almagjában (BNST), a piriformis (Pir) és a cingularis cortexben (Cg) vivőanyaggal (V) vagy 17- β -ösztradiollal (E_2 , 1 μg , 1 h) kezelt gonadektomizált nőstény és hím egerekben. * $p < 0.05$, $n = 6-6$ /csoport. B: A felvételek az ösztrogén-indukált változásokat mutatják pERK1/2 immunreaktív sejtek számában a vivőanyaggal (V), ill. a 17- β -ösztradiollal (E_2) kezelt gonadektomizált nőstény és hím egerek mPOA-jában. A lépték 100 μm .

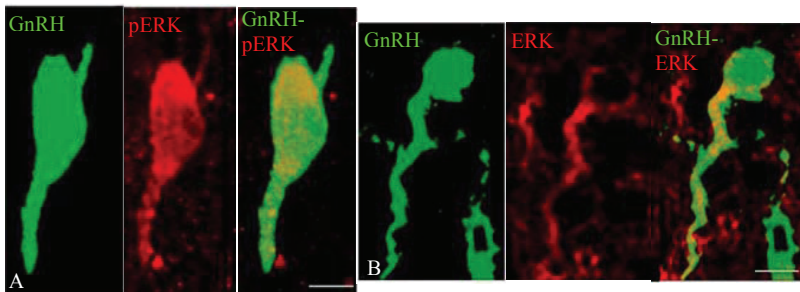
Terület	♀ SHAM	♀ GDX	♂ SHAM	♂ GDX	♀ GDX+E2	♀ GDX+V	♂ GDX+E2	♂ GDX+V
mPOA	434.8±27.1	461.2±29.6	642.7±67.2	642.7±47.1	666.7±136.9	765.6±103.9	539.5±52.1	670.1±36.8
AVPV	464.1±52.4	524.2±54.4	681.7±67.8	752.6±118.9	910.5±85.5	902.5±43.5	1023±172.4	1059±138.1
BNST	524.2±26.5	477.5±19.6	531.1±17.2	591.6±53.6	877.7±69.3	832.8±44.8	772.9±23.6	892.9±75.5
Cg	636.3±55.9	546.4±11.5	598.3±31.5	418.6±21	790.4±44.2	812.3±27.1	753.4±31.4	765±83.5
Pir	640.8±33.8	611.2±34.2	683.6±62.8	727.5±62.8	569.1±11.8	504.5±13.9	883.5±31.4	763.4±54.8

3. táblázat. A gonadektómia és az ösztrogén hatásának összefoglalása az ERK expressziójára a vizsgált agyterületeken.

A táblázatban szereplő adatokat optikai denzitás (pixel/terület)±SEM formában adtuk meg. Rövidítések: GDX: gonadektomizált, SHAM: álműtött, V: vivőanyag, E₂: 17- β -ösztradiol.

5.1.2. Egy-sejt szintű vizsgálatok

A gonadális szteroidok hatását az ERK1/2 foszforilációra a továbbiakban egy sejt szinten, a reprodukció fő szabályozó neuronjában, a gonadotrop releasing hormon (GnRH) neuronokban vizsgáltuk.



9. ábra. A pERK1/2 és az ERK lokalizációja a GnRH neuronokban. A fluoreszcens képek pERK1/2 (A) és ERK immunreaktív GnRH idegsejteket (B) mutatnak. A pERK1/2 immunreaktivitás a GnRH idegsejtek citoplazmájában, magjában, valamint a rostokban is látható (A), míg az ERK immunreaktivitás a sejtek citoplazmájára és nyúlványaira korlátozódik (B). A lépték 10 μ m.

5.I.2.1. A gonadektómia és a gonadális szteroidok hatása az ERK1/2 foszforilációra a GnRH neuronokban

Mivel nőtény egerekben a reprodukcióban fontos szerepet játszó agyi területeken (AVPV, mPOA) a gonadális szteroidok jelentős mértékben módosították az ERK1/2 jelátviteli molekula foszforilációját, ezért megvizsgáltuk a gonadális szteroidok ERK1/2 foszforilációra kifejtett hatását egy-sejt szinten is, a hypothalamus-hypophysis-gonád tengely fő szabályozó neuronjában, a gonadotrop releasing hormon (GnRH) neuronokban.

Elsőként a gonadektómia hatását vizsgáltuk nőtény egerekben. A gonadektómia szignifikánsan növelte az ERK1/2 foszforiláció mértékét ($p < 0.05$) a GnRH neuronokban az álműtött (SHAM) állatokhoz viszonyítva (10. A ábra), míg az ERK expresszió mértéke nem változott a gonadektómiát követően (10. B ábra).

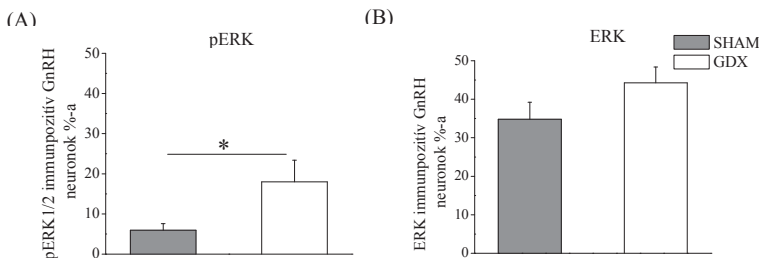
Ezután az ösztrogén gyors ERK1/2 foszforilációt módosító hatását tanulmányoztuk a GnRH neuronokban. Az 1 órás ösztrogénkezelés ERK1/2 foszforilációt módosító hatását azonban nem tudtuk kimutatni a gonadektomizált egerek ERK1/2 foszforilációs szintjéhez képest (11. A ábra).

Mivel azonban a gonadektómia szignifikánsan növelte az ERK1/2 foszforilációt a GnRH neuronokban, tovább tanulmányoztuk a gonadális szteroidok szerepét. Ennek érdekében első lépésben ösztrogénnel (11. A ábra), majd ösztrogénnel és progeszteronnal kezeltük (11. B ábra) a petefészekirtott egereket. Megpróbáltuk modellezni az ösztrozus ciklusnak megfelelő fiziológias hormonszint ingadozásokat, ezért “folyamatos” ösztrogén és progeszteron kezeléseket alkalmaztunk: a kísérleti állatok a kísérlet végéig minden 5. napon 1 μg ösztrogént kaptak ill., a progeszteronnal is kezelt csoport az ösztrogén kezelésre rákövetkező nap délelőttjén 1 μg progeszteront kapott. Azonban sem az ösztrogén, sem a kombinált ösztrogén-progeszteron kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a gonadektómia-okozta ERK1/2 foszforiláció növekedést (11. B, C ábra).

Az ERK és a pERK valamennyi kísérleti csoportban egységesen ugyanolyan expressziós mintázatot mutatott a GnRH neuronokban függetlenül a GnRH idegsejtek lokalizációjától. (Ezeket az adatokat nem ábrázoltam a dolgozatban).

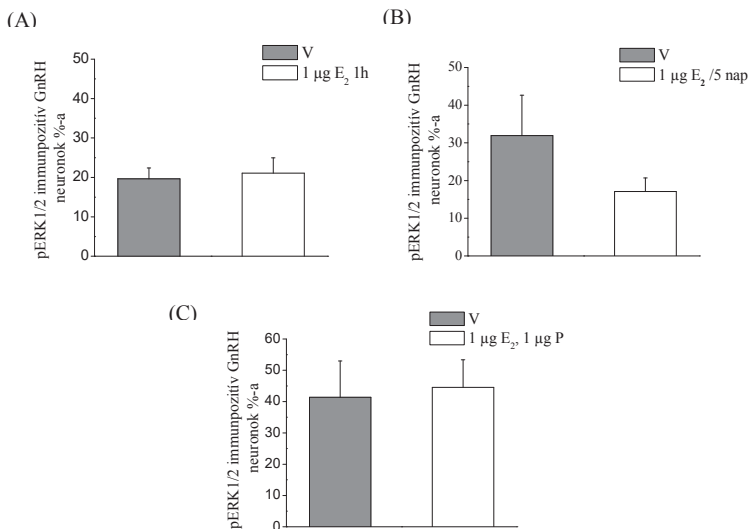
Az ösztrogén kezelések megbízhatóságát, ill. hatékonyságát ösztrogénszint méréssel igazoltuk. (Az 1 órás ösztrogén kezelés esetében az ösztrogén értékek a következők voltak: V: 12.9 ± 3.3 pg/ml, V+E₂: $1.2 \pm 0.2^{***}$ ng/ml; *** = $p < 0.001$). A 11. B grafikon későbbi kísérletek adataiból született, ezek ösztrogén adatait lásd később: 64. oldal, 5.III.

A gonadektómia hatása az ERK1/2 foszforilációra a GnRH neuronokban



10. ábra. A gonadektómia hatása az ERK foszforilációra nőstény egerek GnRH neuronjában. A diagramok a pERK1/2 (A) ill., az ERK (B) immunreaktív GnRH idegsejtek százalékának átlagát (\pm SEM) mutatják álműtött (SHAM) és gonadektomizált (GDX) nőstény egerekben. * $p < 0.05$, $n = 5-5$ /csoport.

A gonadális szteroidok hatása az ERK1/2 foszforilációra a GnRH neuronokban



11. ábra. Az gonadális szteroidok hatása az ERK1/2 foszforilációra nőstény egerek GnRH neuronjában. A diagram a pERK1/2 immunreaktív GnRH idegsejtek százalékának átlagát (\pm SEM) mutatja vivőanyaggal (V) és 17- β -ösztradiollal (E₂, 1 μ g, 5 naponta) (A), 17- β -ösztradiollal és progeszteronnal (E₂, 1 μ g; P, 1 μ g, 5 naponta) (B) ill., 17- β -ösztradiollal (E₂, 1 μ g, 1h) (C) kezelt gonadektomizált nőstény egerekben. $n = 5-7$ /csoport.

5.II. Az immunológiai kihívás hatása az ERK1/2 foszforilációra

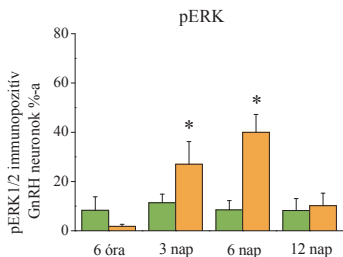
5.II.1. A T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz hatása az ERK1/2 foszforilációra a GnRH neuronokban

A gonadális szteroidok GnRH neuronok ERK1/2 útvonalára gyakorolt hatásának vizsgálata után, az ERK1/2 jelátviteli kaszkád immunstimulus-érzékenységét tanulmányoztuk, mivel annak pontos mechanizmusa, hogy az immunkihívás hogyan képes gátolni a reprodukív funkciókat a GnRH neuronok működésének módosításán keresztül, nem ismert. Ehhez kísérleteinkben a humorális immunválasz kiváltásához T-sejt-függő antigénnel, KLH-FITC-cel immunizáltuk az egereket, majd a kezelés után 6 órával, 3, 6 és 12 nappal megvizsgáltuk az ERK1/2 foszforiláció változását a GnRH idegsejtekben.

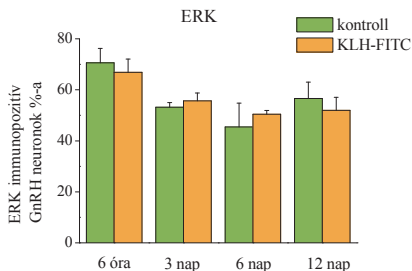
Az immunizálás után 6 órával nem tapasztaltunk változást, 3 nappal a kezelést követően azonban már emelkedést mutatott a pERK1/2 immunreaktív GnRH idegsejtek száma, mely növekedés a 6. napon érte el a maximumát (12. A ábra), vagyis az ERK1/2 foszforilációs változás maximuma abba az időintervallumba esik, amikor már az ellenanyagtermelés is szignifikánsan emelkedik. Az ERK1/2 foszforilációja a 12. napon újra az alapszinthez közeli értéket mutatott (12. A ábra). Az ERK fehérje expressziós szintjének vizsgálatából az is kiderült, hogy a pERK1/2 immunpozitív sejtek számában megfigyelt változás csak az ERK molekula foszforilációs mértékének a következménye, mivel az ERK fehérje expressziós szintje nem változott egyik vizsgált időpontban sem (12. B ábra). Ezen kívül azt is megfigyeltük, hogy az ERK, valamint a pERK1/2 egységesen ugyanolyan expressziós mintázatot mutatott a GnRH neuronokban, függetlenül a GnRH idegsejtek lokalizációjától (medialis septum, anteroventricularis mag, medialis preopticus area és anterior hypothalamus), valamint a GnRH neuronok száma sem változott az immunizálást követően (Ezeket az eredményeket nem ábrázoltam a dolgozatban).

A KLH-FITC oltás hatékonyságának igazolásához az immunizálást követő 6. napon megmértük a FITC ellen termelt ellenanyagok (IgM, IgG) szintjét a szérumban ELISA módszerrel (13. ábra). Annak bizonyítására pedig, hogy az ERK1/2 foszforilációs változás valóban specifikus a FITC antigénre, és nem az immunválasz erősítéséhez használt komplett Freund adjuváns (CFA) okozza a foszforiláció növekedését, megvizsgáltuk a GnRH neuronok foszforilációs státuszát 6 nappal CFA oltás után is (14. ábra).

(A)

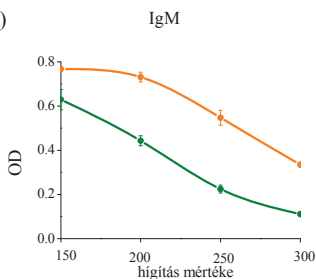


(B)

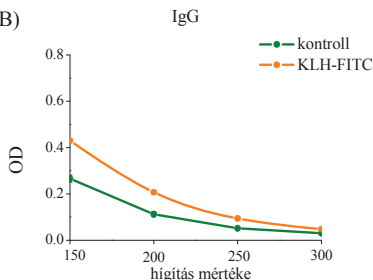


12. ábra. Az ERK1/2 foszforiláció időbeli változása a GnRH neuronokban KLH-FITC-cel történő immunizálás után. Az oszlopdiagramok a pERK1/2 (A) ill., az ERK (B) immunreaktív GnRH neuronok százalékanak átlagát (\pm SEM) mutatják intakt nőtény egerekben 6 órával, 3, 6 és 12 nappal a KLH-FITC kezelést követően. * $p < 0.05$, $n = 5$ /csoport.

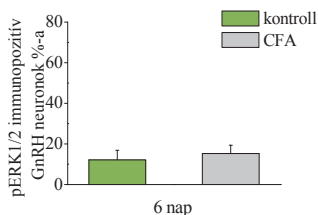
(A)



(B)



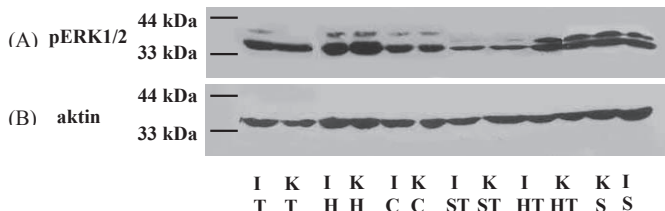
13. ábra. A FITC ellen termelt ellenanyagok szintje a vérérszumban KLH-FITC oltás után 6 nappal. A grafikonok az IgM (A) és az IgG (B) típusú ellenanyagok szintjét mutatják 6 nappal a KLH-FITC oltás után intakt nőtény egerekben. Az ábrázolt optikai (OD) értékeket az egyes kísérleti csoportokban szereplő egyedek szérumból mintáinak összesítése után, a párhuzamos mérések átlagolásával kaptuk meg (\pm SD). $n = 4$ -5/csoport.

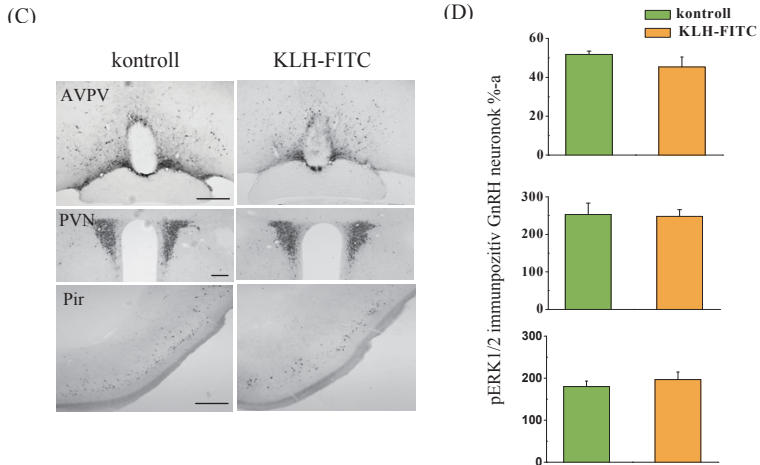


14. ábra. A CFA hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára. Az oszlopdiagram a pERK1/2 immunreaktív GnRH neuronok százalékanak átlagát (\pm SEM) mutatja intakt nőtény egerekben 6 nappal a CFA oltás után. $n = 4$ -5/csoport.

5.II.2. A T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz hatása az ERK1/2 foszforilációra az egér agy különböző előagyi és köztiagyi területein.

A következő kísérletben megvizsgáltuk, hogy a megfigyelt T-sejt-dependens humorális immunválasz-indukált ERK1/2 foszforilációs változás általános jelensége-e az egér agyban vagy specifikus a GnRH neuronokra. Az ERK1/2 foszforiláció növekedés a 3. napon már láthatóan emelkedett, maximumát azonban az immunizálást követő 6. napon érte el, ezért a továbbiakban valamennyi kísérletünket erre az időpontra terveztük. Elsőként Western blot analízissel hasonlítottuk össze az immunizált és a kontroll egerek egyes agyi régióinak pERK1/2 fehérje szintjét, melyek a következők voltak: septum (S), hypothalamus (HT), striatum (ST), thalamus (T), hippocampus (H) és cortex (C). A vizsgált területek egyikén sem láttunk változást a pERK1/2 fehérje expressziós szintjében (15. A ábra). Annak ellenőrzésére, hogy az egyes mintákból azonos fehérjemennyiségeket futtattunk aktin kontrollt alkalmaztunk (15. B ábra). Ezután további agyterületeket hasonlítottunk össze kvantitatív immunhisztokémia segítségével. Ez lehetővé tette az agyi régiók részletesebb, pontosabb analízisét, az esetleges pERK1/2 immunpozitív sejtszámváltozás vizsgálatát is. A következő agyi területeket ill., magokat elemeztük: anteroventralis periventricularis mag (AVPV), medialis preopticus area (mPOA), paraventricularis mag (PVN), piriformis cortex (Pir), cingularis cortex (Cg), motoros cortex (M1-2). Összhangban a Western blot eredményeivel a kvantitatív immunhisztokémia eredményei alapján a KLH-FITC 6 nappal az immunizálás után nem indukál ERK1/2 foszforilációs változást egyik általunk vizsgált területen sem összevetve a kontroll és az immunizált egereket (15. C ábra; AVPV: $45,37 \pm 5,08$; $51,75 \pm 1,71$; mPOA: $127,5 \pm 8,72$; $127,5 \pm 15,89$; PVN: $248,04 \pm 17,74$; $253 \pm 30,58$; Pir: $196,63 \pm 17,9$; $179,88 \pm 13,21$; Cg: $57,5 \pm 4,48$; $75,5 \pm 13,2$; M1-2: $84,08 \pm 3,43$; $75,03 \pm 10,45$).





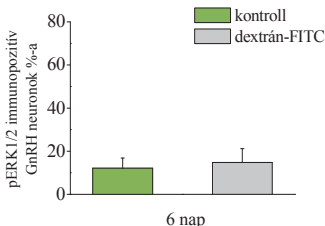
15. ábra. A KLH-FITC hatása ERK1/2 foszforilációra az agyban. A felvételek (A, B) a pERK1/2 fehérje szintjét ill., az aktin fehérje expresszió mértékét ábrázolják KLH-FITC-cel oltott (I) és kontroll (K) egerekben. $n=5-5$ /csoport. A fénymikroszkópos felvételek (C) pedig néhány reprezentatív agyterület (AVPV, PVN, Pir) pERK1/2 fehérje expressziós mintázatát mutatják a KLH-FITC-cel kezelt és kontroll egerekben. A hozzájuk tartozó diagramok (D) a pERK1/2 immunreaktív sejtek számát (\pm SEM) ábrázolják a két kísérleti csoportban. $n=5-5$ /csoport. Rövidítések: K: kontroll, I: immunizált, T: thalamus, H: hippocampus, C: cortex, ST: striatum, HT: hypothalamus, S: septum, AVPV: anteroventralis periventricularis mag, PVN: paraventricularis mag, Pir: piriformis cortex. A léptéket jelző szakasz 150 μ m a felvételeken.

5.II.3. Az immunkihívás GnRH neuronokban indukált ERK1/2 foszforilációjának lehetséges mechanizmusa

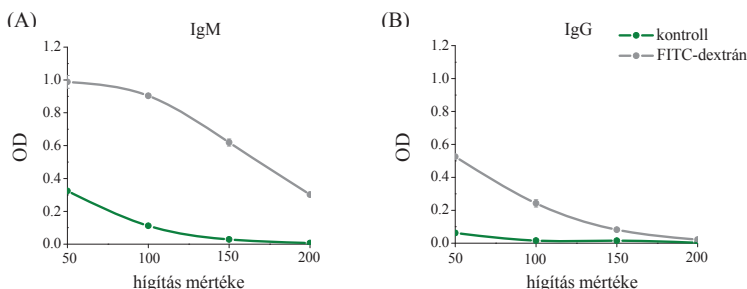
5.II.3.1. Az antigén szerepének vizsgálata

Az immunstimulus-okozta ERK1/2 foszforiláció antigén-specifikusságának megállapításához T-sejt-független antigénre adott humorális immunválaszt indukáltunk az egerekben. A humorális immunválasz ezen típusának kiváltásához ugyancsak FITC-et használtunk antigénként, a korábbiakban használt KLH helyett viszont dextránt alkalmaztunk hordozóként. A dextrán-FITC ugyanis számos azonos antigénepitóppal rendelkezik, mely ismétlődő epitópok hatékonyan kapcsolják össze a B-sejtek membrán immunglobulinjait (mIg), ami a B-sejtek T-sejt nélküli aktivációjához vezet. Az immunizálás ebben az esetben is hatékony volt (17. A, B ábra), a dextrán-FITC-cel történő immunizálás utáni 6. napon azonban nem láttunk változást a GnRH neuronok ERK1/2

foszforilációjában a kontroll (PBS-sel “oltott”) csoporthoz viszonyítva (16. ábra). Ez az eredmény arra utal, hogy az ERK1/2 foszforiláció növekedés létrejötte függ az antigén típusától.



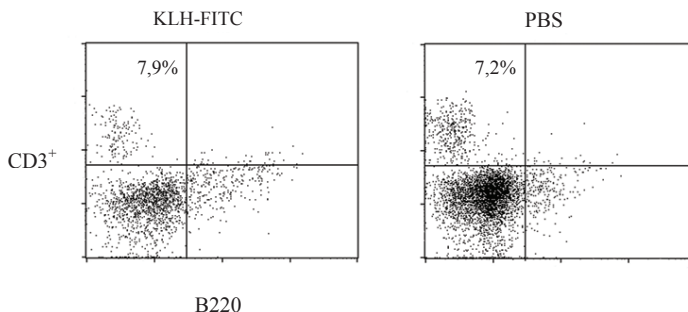
16. ábra. A dextrán-FITC hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára. A grafikon a pERK1/2 immunreaktív GnRH neuronok százalékának átlagát (\pm SEM) mutatja intakt nőstény egerekben 6 nappal a dextrán-FITC oltás után. n=4-5/csoport.



17. ábra. A FITC ellen termelt ellenanyagok szintje a szérumban dextrán-FITC oltás után. A grafikonok az IgM (A) és az IgG (IgG) típusú ellenanyagok szintjét mutatják 6 nappal a dextrán-FITC oltás után intakt nőstény egerekben. Az ábrázolt optikai denzitás (OD) értékeket az egyes kísérleti csoportokban szereplő egyedek vérszérumainak összesítése után mértük. Minden csoport esetében három párhuzamos mérés történt (\pm SD). n=4-5/csoport.

5.II.3.2. A T-sejtek szerepének vizsgálata

A gyulladásos folyamatok során a periférián aktiválódott T-sejtek bejuthatnak az agyba, és ott esetleg közvetlenül befolyásolhatják az ERK1/2 foszforilációt. Ezért megvizsgáltuk, hogy a KLH-FITC oltás hatására történik-e agyi T-sejt bevándorlás. Ennek vizsgálatához áramlási citofluorimetriával összehasonlítottuk a KLH-FITC-cel kezelt és a kontroll egerek agyában lévő CD3⁺ T-sejtek százalékos arányát. A KLH-FITC-cel immunizált egerekben a kijelölt sejtpopuláció 7,9 %-a, a kontroll állatokban pedig a 7,2 %-a volt CD3⁺ T-sejt (18. ábra). Vagyis a kontroll és az immunizált egerek között nem találtunk különbséget a CD3⁺ T-sejtek arányában, KLH-FITC hatására tehát nem történik T-sejt bevándorlás az agyba.



18. ábra. A CD3⁺ T-sejtek százalékos aránya az agyban. Az ábrák a CD3⁺ T-sejtek százalékos arányát mutatják KLH-FITC-cel immunizált (A) és nem immunizált (B, PBS kontroll) egerek agyában. A “plotokon” szereplő értékek a “dot plotok” FSC (előre irányuló fényszórás) és SSC (oldalra irányuló fényszórás) értékei alapján meghatározott limfocitapopuláción belüli CD3⁺ T-sejt populáció százalékos arányát jelölik. Az adatok két különálló, egyenként 4-4 állattal végzett kísérlet reprezentatív eredményét mutatják be.

5.II.3.3. A citokinek szerepének vizsgálata

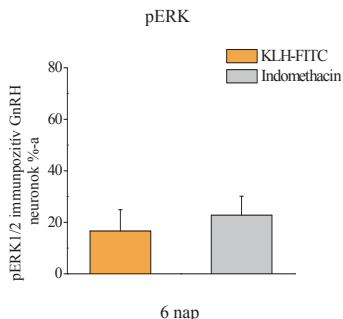
A proinflammatorikus citokinek immunkihívás által kiváltott ERK1/2 foszforilációban betöltött szerepét az agyban lévő IL-1 β és TNF- α mennyiségének mérésével vizsgáltuk meg. Az IL-1 β és a TNF- α proinflammatorikus citokinek ELISA-val meghatározott expressziós szintje nem mutatott változást a KLH-FITC-cel immunizált egerek agyában a kontrollhoz (PBS) képest (19. ábra).

	KLH-FITC	PBS
IL-1 β	≤ 3	≤ 3
TNF- α	16,14 \pm 2,27	13,88 \pm 4,94

19. ábra. Proinflammatorikus citokinek mennyisége az agyban KLH-FITC-indukált perifériás gyulladást követően. Az ábrázolt értékeket átlag \pm SEM pg fehérje/100 mg agyszövet formában adtuk meg.

5.II.3.4. A proszttaglandinok szerepének vizsgálata

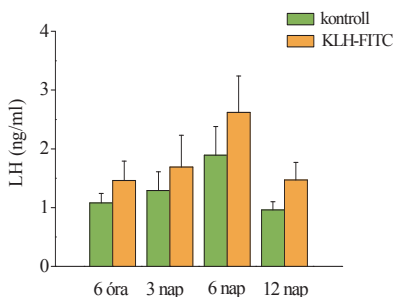
Kísérleteink folytatásaként a proszttaglandinok immunstimulus által okozott ERK1/2 foszforiláció növekedésben betöltött szerepét vizsgáltuk meg. A kísérleti állatokat a KLH-FITC-cel történő oltást megelőzően, valamint azt követően a perfúzióig minden nap Indomethacinnal, a proszttaglandin (PG) szintéziséhez szükséges ciklooxygenáz 1, 2 (COX1,2) enzim nem szelektív inhibitorával kezeltük. Az Indomethacin kezelés azonban nem eredményezett szignifikáns változást a csak KLH-FITC-cel kezelt csoporthoz képest (20. ábra).



20. ábra. Az Indomethacin hatása a KLH-FITC által GnRH neuronokban indukált ERK1/2 foszforilációra. Az oszlopdiagram a pERK1/2 immunreaktív GnRH neuronok százalékaának átlagát (\pm SEM) ábrázolja KLH-FITC-cel immunizált és KLH-FITC-cel immunizált + Indomethacinnal kezelt kísérleti csoportokban. $n=5$ -5/csoport.

5.II.4. Az immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforiláció szerepe a hypothalamus-hypophysis-gonád (HPG) tengely szabályozásában

A GnRH neuronokban megfigyelt immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforiláció hypothalamus-hypophysis-gonád tengely szabályozásában betöltött szerepének vizsgálatához az esetleges hormonszint változásokat próbáltuk nyomonkövetni. Egyrészt indirekt módon az egerek ösztroz ciklusának megállapításával következtettünk a szervezetükben zajló hormonális változásokra. Ehhez két héttel az immunizálást megelőzően, illetve az azt követő két hétben minden nap vaginális kenetet vettünk a kísérleti állatoktól, és meghatároztuk az ösztroz ciklusuk stádiumát. A KLH-FITC-cel immunizált egerek ösztroz ciklusában azonban nem láttunk eltérést a kontroll egerekhez viszonyítva. A hormonszint közvetlen vizsgálatához a plazma luteinizáló hormon (LH) koncentrációját mértük négy időpontban: 6 órával, 3, 6 és 12 nappal az immunizálás után. Azonban egyik időpontban sem láttunk szignifikáns változást a két kísérleti csoport között (21. ábra).



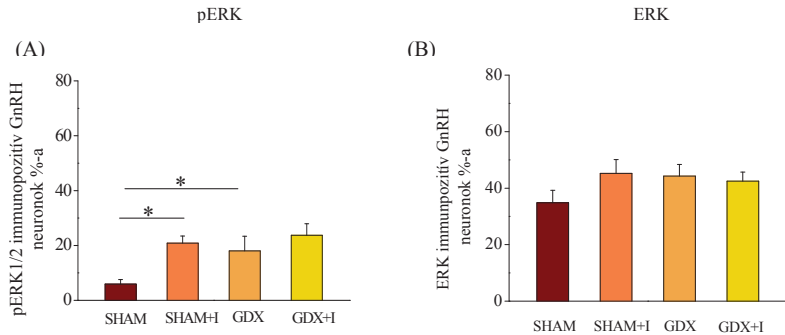
21. ábra. A luteinizáló hormon (LH) szintje a plazmában. A grafikon az LH koncentrációját mutatja kontroll és KLH-FITC-cel immunizált egerek plazmájában 6 órával, 3, 6 és 12 nappal az immunizálás után. Az oszlopdiagramok az átlag LH koncentráció (\pm SEM) ng/ml-ben kifejezett értékeit mutatják.

5.III. A gonadális szteroidok és az immunológiai kihívás interakciójának hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára

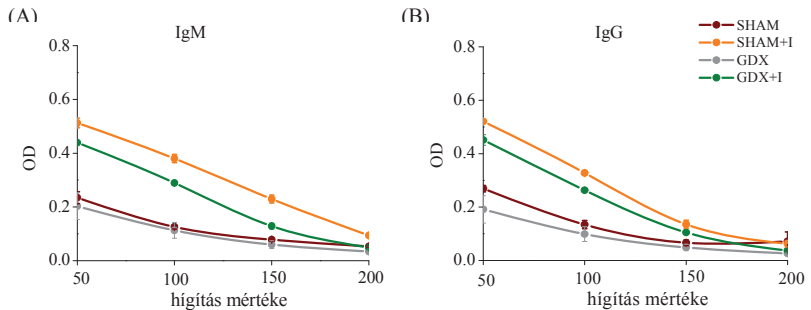
További kísérleteinkben azt tanulmányoztuk, hogy a gonadális szteroidok befolyásolják-e az immunológiai kihívás ERK1/2 foszforiláció módosító hatását a GnRH idegsejtekben, mivel az ösztrogén szabályozó szerepe az immunstimulus által okozott agyban zajló folyamatokban jól ismert. Ehhez első lépésként petefészekirtott (GDX) és álműtött egerekben (SHAM) hasonlítottuk össze a T-sejt-függő B-sejt-közvetített immunválaszt kiváltó KLH-FITC hatását az oltást követő 6. napon (22. A ábra). A gonadektomizált egerekben nem sikerült kimutatnunk a KLH-FITC ERK1/2 foszforiláció moduláló hatását, ezzel szemben az álműtött állatokban szignifikánsan növelte az immunizálás a foszforiláció mértékét a korábbiakban bemutatott intakt nőstényekhez hasonlóan (22. A ábra). Az immunológiai kihívás hatékonyan növelte az ellenanyagszintet a vérben (23. A, B ábra) és az ellenanyag termelő plazmasejtek számát a lépben (a dolgozatban nem bemutatott eredmények) a petefészekirtott és az álműtött egerekben egyaránt (SHAM-SHAM+I; GDX-GDX+I).

Ezek alapján feltételeztük, hogy a gonadális szteroidok, vagy azok valamelyike nélkülözhetetlen az immunstimulus-okozta ERK1/2 foszforiláció növekedés kiváltásához. Így kísérleteink második részében ösztrogén visszapótlás után vizsgáltuk meg a KLH-FITC hatását petefészekirtott egerekben, hormonkezelést nem kapott gonadektomizált egerekhez viszonyítva. Összesen négy kísérleti csoportot hoztunk létre: gonadektomizált, 17- β -ösztradiollal kezelt, nem immunizált (E_2); gonadektomizált, 17- β -ösztradiollal kezelt, immunizált (E_2 +I); gonadektomizált, vivőanyaggal kezelt, nem immunizált (V) és gonadektomizált, vivőanyaggal kezelt, immunizált (V+I) csoportokat. Azt találtuk, hogy az ösztrogénnel kezelt, immunizált egerek ERK1/2 foszforilációs szintje szignifikáns növekedést mutatott a másik három kísérleti csoporthoz képest, a „csak” ösztrogén-kezelt, a „csak” immunizált és a „nem kezelt” egerekhez viszonyítva is (24. A ábra). Az immunizálás ebben a kísérletben is szignifikánsan növelte az IgM és IgG ellenanyagok szintjét a vérben a megfelelő kontrollhoz viszonyítva (V-V+I; E_2 - E_2 +I) (25. A, B ábra), valamint az ellenanyagtermelő sejtek számát a lépben (a dolgozatban nem bemutatott eredmények). Az ösztrogén kezelés hatékonyságának közvetett bizonyítékeként látható az ábrákon az ösztrogén - irodalmi adatokból jól ismert - immunstimuláló hatása (V- E_2 , I- E_2 +I). (A RIA-val meghatározott ösztrogén értékek: V: 9.42 ± 5.78 pg/ml, V+I: 11.12 ± 1.98 pg/ml, V+ E_2 : 25.71 ± 17.14 pg/ml, V+ E_2 +I: 24.46 ± 4.11 pg/ml). Az ERK expresszió szintje nem változott a kísérleti csoportokban egyik kísérletben sem (22. B, 24. B ábra).

A gonadektómia szerepe az ERK1/2 foszforilációban

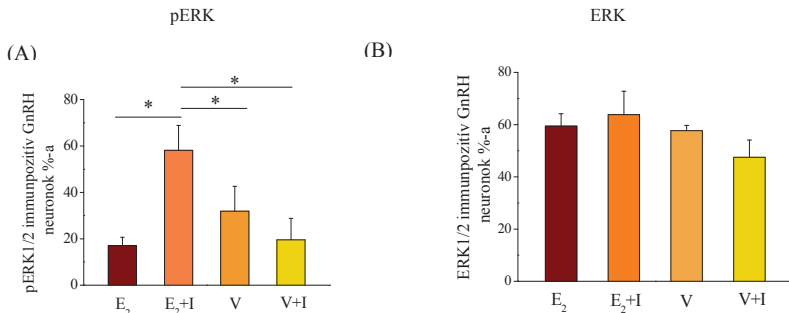


22. ábra. A gonadektómia hatása az immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforilációra. Az oszlopdiagramok a pERK1/2 (A) ill., az ERK (B) immunreaktív GnRH neuronok százalékának átlagát (\pm SEM) ábrázolják álműtött, nem immunizált (SHAM); álműtött, immunizált (SHAM+I); gonadektomizált, nem immunizált (GDX) és gonadektomizált, immunizált (GDX+I) nőstény egerekben. * $p < 0.05$, $n = 6-6$.

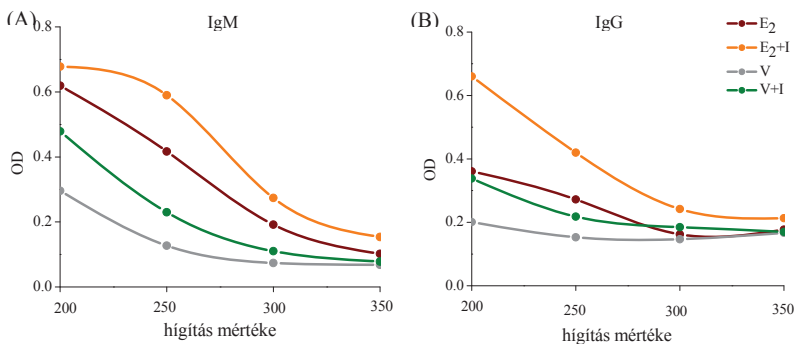


23. ábra. A FITC ellen termelt ellenanyagok szintje a szérumban gonadektómia hatására. A grafikonok az IgM (A) és az IgG (B) típusú ellenanyagok szintjét mutatják 6 nappal a KLH-FITC oltás után nem immunizált (SHAM); álműtött, immunizált (SHAM+I); gonadektomizált, nem immunizált (GDX) és gonadektomizált, immunizált (GDX+I) nőstény egerekben. Az ábrázolt optikai denzitás (OD) értékek az egyes kísérleti csoportokban szereplő egyedek összesített szérumaira vonatkoznak, melyeket három párhuzamos mérés átlagából számoltunk ki (\pm SD). $n = 6-6$.

Az ösztrogén szerepe az ERK1/2 foszforilációban



24. ábra. Az ösztrogén szerepe az immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforilációban. Az oszlopdiagramok a pERK1/2 (A) ill., az ERK (B) immunreaktív GnRH neuronok százalékának átlagát (\pm SEM) mutatják gonadektomizált, 17- β -ösztradiollal kezelt, nem immunizált (E₂); gonadektomizált, 17- β -ösztradiollal kezelt, immunizált (E₂+I); gonadektomizált, vivőanyaggal kezelt, nem immunizált (V) és gonadektomizált, vivőanyaggal kezelt, immunizált (V+I) nőstény egerekben. * $p < 0.05$, $n = 5-7$.



25. ábra. A FITC ellen termelt ellenanyagok szintje a szérumban ösztrogén hatására. A grafikonok az IgM (A) és az IgG (B) típusú ellenanyagok szintjét mutatják 6 nappal a KLH-FITC oltás után gonadektomizált, 17- β -ösztradiollal kezelt, nem immunizált (E₂); gonadektomizált, 17- β -ösztradiollal kezelt, immunizált (E₂+I); gonadektomizált, vivőanyaggal kezelt, nem immunizált (V) és gonadektomizált, vivőanyaggal kezelt, immunizált (V+I) nőstény egerekben. Az ábrázolt optikai denzitás (OD) értékek az egyes kísérleti csoportokban szereplő egyedek összesített szérumaira vonatkoznak, melyeket három párhuzamos mérés átlagából számoltunk ki (\pm SD). $n = 6-6$.

6. MEGVITATÁS

6.1. A gonadális szteroidok hatása az ERK foszforilációra

Kísérleti eredményeink az ERK1/2 foszforiláció jelentős nemi- és régió-specifikus különbségeit fedték fel gonadektómia és ösztrogén kezelés hatására az egér agyban. A nőstényekkel összevetve a hím egerek AVPV-je szignifikánsan több pERK1/2 immunreaktív sejtet tartalmaz. A gonadektómia a hímek piriform cortexében szelektíven csökkentette, míg nőstényekben az AVPV területén növelte a pERK1/2 pozitív sejtek számát. Az ösztrogén kezelésnek a hím egerek esetében nem volt hatása az ERK1/2 foszforilációra, a nőstényekben viszont növelte a pERK1/2 immunpozitív sejtek számát az AVPV-ben és a mPOA-ban egyaránt. A gonadektómiának és az ösztrogén kezelésnek az ERK expresszióra azonban nem volt hatása egyik vizsgált területen, ill. egyik nem esetében sem.

Egy-sejt szintű vizsgálataink során kimutattuk azt is, hogy a hypothalamus-hypophysis-gonád tengely fő szabályozó neuronjában, a gonadotrop releasing hormon neuronban az 1 órás ösztrogén kezelés nem módosította az ERK1/2 foszforilációt, vagyis az ösztrogén gyors, nem-klasszikus hatásai ebben a sejttypusban - legalább is ebben az időintervallumban - feltehetően nem az ERK1/2 jelátviteli útvonalon keresztül érvényesülnek. A gonadektómia viszont szignifikánsan növelte az ERK1/2 foszforilációt, amit azonban sem az ösztrogén, sem az ösztrogén-progeszteron kombinált adása nem volt képes visszaállítani az alapszintre. Ez alapján feltételezzük, hogy a petefészekirtás után tapasztalt ERK1/2 foszforiláció növekedés inkább a gonádok és a központi idegrendszer közötti kapcsolatok sérülésének tulajdonítható, mint a gonadális szteroidok hiányának.

6.1.1. A szexuálisan dimorf ösztrogén-indukált ERK1/2 foszforiláció lehetséges mechanizmusa és fiziológiás következményei az AVPV-ben és a mPOA-ban

Jelen tanulmányunkban a korábbi eredményekkel egyezően (Ábrahám és mtsai, 2004) az ösztrogén ERK1/2 foszforilációra kifejtett robusztus hatását bizonyítottuk az AVPV és a mPOA területén is. Bryant és munkatársai (Bryant és mtsai, 2005) azonban ezeken az agyi területeken nem mutattak ki növekedést az ERK foszforilációban ösztrogén adást követően patkány agyban. Ez az eltérés az esetleges fajok közötti különbségeken kívül metodikai különbségekkel is magyarázható. Bryant és munkatársai mikrodisszekált mintákon Western blot analízist végeztek, míg mi fagyasztott agyszöveten immuncitokémia segítségével vizsgáltuk a foszforilációs változásokat. Az AVPV és a mPOA területén az

ösztrogén-indukált ERK1/2 foszforilációban látott nemi különbségek oka lehet az ER típusok két nemben eltérő eloszlása és denzitása ezeken az agyterületeken. A csoportunkban végzett korábbi kísérletek eredményei szerint az ösztrogén-indukált CREB és ERK1/2 foszforiláció a nőstény egerek hypothalamusában függ a klasszikus ösztrogén receptoroktól, a mPOA esetében az ER α és az ER β koexpressziójától. Ezen a területen mindkét receptor expressziója szükséges az ösztrogén-indukált pERK1/2 expresszió növekedéséhez, vagyis az ER α /ER β sejten belüli aránya fontos szerepet játszhat az ösztrogén nem-klasszikus hatásaiban, köztük az ERK1/2 foszforiláció mechanizmusában (Ábrahám és mtsai, 2004). Hím egerekben a mPOA és az AVPV több ER β mRNS-t és fehérjét tartalmaz, mint nőstényekben (Orikasa és mtsai, 2002; Kudwa és mtsai, 2004), míg az ER α expresszió mértéke hasonló a két nemben (Mitra és mtsai, 2003; Kudwa és mtsai, 2004). Bryant és munkatársainak kísérlete, miszerint az ösztrogén-indukált pERK1/2 expresszió növekedés nem korrelál az agyi ER denzitással, is azt támasztja alá, hogy az ER α /ER β arány fontosabb szerepet játszhat az ER-ok mennyiségénél az ösztrogén-indukált ERK1/2 foszforiláció növekedésében, ill. annak szexuális dimorfizmusában. A dolgozatban bemutatott eredmények is ezt a feltevést erősítik. Az AVPV és a mPOA is, ahol mind az ER α , mind az ER β nagyobb mennyiségben fordul elő (Mitra és mtsai, 2003), érzékeny az ösztrogén-indukált ERK1/2 foszforilációs változásokra, ezzel ellentétben a BNST-ben nem tapasztaltunk változást a pERK1/2 sejtek számában az ER α és az ER β nagy denzitása (Mitra és mtsai, 2003; Shugrue és mtsai, 1998) ellenére sem. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy a jelenlegi magi elhelyezkedésű ösztrogén receptor denzitás adatok nagy mértékben függenek attól, hogy melyik ER ellen kifejlesztett antitestet használták az ER-ok denzitásának térképezésére. Így az ER α /ER β arány nem kizárólagos szerepét javasoljuk az ösztrogén ERK1/2 szignálizációs útvonalra kifejtett hatásában, de egy lehetséges alternatívaként jelöljük meg.

Korábbi munkák szerint csak membrán vagy citoplazmatikus elhelyezkedésű ER-ok vehetnek részt az ösztrogén által módosított ERK1/2 foszforilációban (Watters és mtsai, 1997; Bulayeva és mtsai, 2004). Korábban igazoltuk, hogy a klasszikus ER-ok mediálják az ösztrogén ERK1/2 ill., CREB foszforilációra kifejtett hatását egér agyban (Ábrahám és mtsai, 2004), így az ER-ok sejten belüli elhelyezkedése meghatározhatja az ösztrogén nem-klasszikus hatásait. Ezek alapján feltételezhetjük azt is, hogy a membránban, ill. a citoplazmában található ER-ok aránya fontos faktor lehet a szexuálisan dimorf ERK1/2 foszforilációban.

A szexuálisan dimorf ösztrogén-indukált ERK1/2 foszforiláció másik lehetséges magyarázatát a hypothalamusban a GABA-erg neuronok adják. A GABA release különböző a két nemben (Mitsushima és mtsai, 2003) és a GABA-erg sejtek részt vesznek az LH release szexuálisan dimorf mintázatának kialakításában (Wagner és mtsai, 2001). Az ösztrogén GABA ürülést okoz a hypothalamusban (Tin-Tin-Win-Shwe és mtsai, 2004), ami hatékonyan redukálja az ERK foszforilációt az agyban metabolikus termékén, a gamma-hidroxybutiráton (GHB) keresztül (Ren és Mody, 2003). A GABA-erg interneuronok különböző fenotípusú sejtekhez projiciálnak a hypothalamusban mindkét nemben. A GABA-t szintetizáló fő enzim (GAD 65) expressziója azonban nemi különbséget mutat; alacsonyabb a nőstény rágsálók hypothalamusában (Perrot-Sinal és mtsai, 2001). Ennélfogva az ERK foszforiláció ösztrogén-indukált gátlása a GHB-n keresztül kevésbé lehet hatékony nőstényekben, mint hímekben. A GABA-erg rendszer tehát hozzájárulhat az ösztrogén-indukált ERK1/2 foszforilációban megfigyelt különbségekhez. Az AVPV-ben a GABA-erg interneuronok mellett az pERK1/2-t expresszáló sejtek számában megfigyelt különbségek is szerepet játszhatnak ebben a folyamatban. Azt láttuk ugyanis, hogy a SHAM és a GDX hímek több pERK1/2-t expresszáló sejtet tartalmaznak az AVPV-ben, mint a nőstény egerek. Figyelembe véve ezt, és azt az ismert tényt, hogy az AVPV kevesebb neuront tartalmaz hímekben, mint nőstényekben (Davis és mtsai, 1996), adataink alapján feltételezzük, hogy hímekben a neuronok pERK1/2 telítettsége okozhatja az ösztrogénre való relatív érzéketlenséget.

Az AVPV és a mPOA területén észlelt ERK1/2 foszforilációs különbségek nemi dimorfizmusának mechanizmusa mellett lényeges kérdés, hogy mi lehet a megfigyelt jelenség fiziológiás szerepe. A legújabb kísérleti eredmények szerint az extracellulárisan regulált kináz jelátviteli út vonal részt vesz a nőstény rágsálók reprodukciós viselkedésének kialakításában (Acosta Martinez és mtsai, 2006). Az AVPV és az mPOA pedig fontos agyterületek a szaporodás és a szexuális viselkedés regulációjában (Wiegand és mtsai, 1980, 1982; Kartha és Ramakrishna, 1996). Az AVPV-nek már kis mértékű léziója is blokkolja a ciklikus LH release-t nőstény patkányban (Wiegand és mtsai, 1980, 1982), míg az mPOA elsősorban a hímek szexuális viselkedésének szabályozásáért felelős (Kantha és mtsai, 1996). Ezenkívül az mPOA-ban található idegi hálózatok az ösztrogén hatások fontos célpontjai a szexuális viselkedés nemek közti különbségeinek létrehozásában (Flanagan-Cato, 2000).

Az AVPV-ben és az mPOA-ban észlelt ösztrogén-függő ERK1/2 foszforiláció ivari dimorfizmusának fiziológiai relevanciája tehát még nyitott kérdés, de eddigi ismereteink alapján feltételezhetjük, hogy a reprodukció és a szexuális viselkedés szabályozásában vesznek részt.

6.1.2. A gonadektómia szexuálisan dimorf hatása a Pir-ben

A Pir-ben a gonadektómia ERK1/2 foszforilációra kifejtett szexuális dimorfizmusát mutattuk ki, az ösztrogénnek azonban nem tudtuk hasonló jellegű hatását detektálni. Hímekben a gonadektómia szignifikánsan csökkentette a pERK1/2 immunpozitív sejtek számát a Pir-ben, az ösztrogén injekció viszont egyik nemből sem okozott változást. A hímekben megfigyelt változás tehát nem az ösztrogén szinttel korrelál. Hasonló jelenséget figyeltünk meg az AVPV esetében is. Nőstény egerekben mind a gonadektómia, mind az ösztrogén kezelés növelte a pERK1/2 immunreaktív sejtek számát. Ennek a látszólagos ellentmondásnak az oka nem tisztázott, de feltételezzük, hogy más gonadális szteroidok is mint a progeszteron vagy a tesztoszteron jelentős szabályozó szereppel bírnak az ERK1/2 foszforilációban (Goodenough és mtsai, 2000; Singh és mtsai, 2001).

A Pir mint olfaktorikus agyi régió bemenetet kap a bulbus olfactoriusból és meghatározó szerepű a szaglási információk feldolgozásában. Humán kísérleti adatok szerint a szaglási információk feldolgozása eltérő a két nemből, a nők pontosabban ismerik fel és különítik el az olfaktorikus ingereket (Bengston és mtsai, 2001). Irodalmi adatok számolnak be arról is, hogy az ERK részt vesz a szaglási érzet kialakításában a Pir-ben, mivel a szaglórendszer ingerlése után gyorsan nő az ERK foszfatáz gén expressziója a patkány piriformis cortexében (Bernabeu és mtsai, 2000), valamint az ERK gyorsan aktiválódik a hím egerek vomeronasalis rendszerének neuronjaiban is (Dudley és mtsai, 2001). Eredményeink, valamint eddigi irodalmi ismereteink alapján úgy gondoljuk, hogy a gonadális szteroid-indukált ERK1/2 foszforilációnak a Pir-ben szerepe lehet a szexuálisan dimorf szaglási ingerek feldolgozásában.

Az ERK1/2 foszforilációban megfigyelt nemi eltérések funkciója azonban megválaszolatlan kérdés marad az ösztrogén-indukált ERK1/2 foszforiláció specifikus célgénjeinek és géntermékeinek azonosításáig.

6.1.3. Az ERK1/2 lehetséges szerepe az ösztrogén CREB foszforilációra kifejtett szexuálisan dimorf hatásában és módszertani következtetések

Adataink összhangban állnak korábbi megfigyeléseinkkel (Ábrahám és mtsai, 2004) miszerint az ösztrogénnek nincs hatása az ERK1/2 foszforilációra a Cg-ben. Korábbi eredményeink alapján az ERK1/2-nek szerepe lehet az ösztrogén CREB foszforilációra kifejtett szexuálisan dimorf hatásában. Kimutattuk ugyanis, hogy az ösztrogénnek nincs hatása a CREB foszforilációra a Cg-ben egyik nemből sem (Ábrahám és mtsai, 2005). Továbbá leírtuk azt is, hogy az ösztrogén szignifikánsan növelte a pCREB immunreaktív sejtek számát a mPOA-ban nőstényekben, hímekekben viszont nem módosította azt (Ábrahám és mtsai, 2005). Ehhez hasonló eredményt kaptunk jelen tanulmányunkban is: az ösztrogén nem befolyásolta a pERK1/2 expressziót a Cg-ben egyik nemből sem, míg ösztrogén-indukált ERK1/2 foszforilációt a mPOA-ban csak nőstényekben figyeltünk meg. Bár adataink alapján nem állíthatjuk, hogy a megfigyelt CREB ill., ERK1/2 foszforiláció a Cg ill., a mPOA ugyanazon fenotípusú sejtjeit érinti, de feltételezhetjük, hogy az ERK1/2 foszforilációja ún. “upstream” szignálként részt vehet az ösztrogén-indukált CREB foszforiláció nemi dimorfizmusának kialakításában.

A Cg-hez hasonlóan a gonadektómia és az ösztrogén kezelés a BNST-ben sem módosította a pERK1/2 pozitív sejtek számát. Ez a mag szexuálisan dimorf leszálló pálya tagjaként olfaktórikus információkat közvetít a bulbus olfactorius accessoriusból a mPOA-ba és a ventromediális hypothalamicus magba (Simerly, 2002). Bár a Pir-ben kapott eredményeink azt mutatják, hogy az ERK1/2 foszforilációnak szerepe van a szaglási információk szexuálisan dimorf feldolgozásában, a BNST-ben nem láttunk hasonló jelenséget, ami a jelrendszer szövetspecifitására utalhat. Azt azonban érdemes megjegyezni, hogy a pERK1/2-t expresszáló idegsejt típusokat nem azonosítottuk és az ösztrogén adást követő ERK1/2 foszforiláció időbeli lefutását sem vizsgáltuk. Ennélfogva a pERK1/2 expressziójának általunk detektált változatatlansága nem feltétlenül jelenti az expressziós szint állandóságát; ez a kísérleteinkben használt metodika korlátainak következménye is lehet.

Eredményeink szerint az ösztrogén hatása az ERK1/2 foszforilációra nemi különbséget mutat specifikus agyi területeken *in vivo*. Ezen kívül adataink alapján feltételezzük, hogy az ösztrogén-függő, nem-klasszikus mechanizmusok részt vesznek azoknak a nemi különbségek mutatató hálózatoknak a modulálásában, melyek a reprodukció funkciókat és a magasabb szintű kognitív információ feldolgozást szabályozzák.

6.1.4. Az ERK1/2 foszforiláció gonadális szteroid érzékenysége és az ERK1/2 útvonal lehetséges szerepe a GnRH neuronokban

Kimutattuk, hogy a petefészekirtás szignifikánsan növeli az ERK1/2 foszforilációt a nőstény egerek GnRH neuronjában. Ez az ERK1/2 foszforiláció növekedés adódhat valamelyik fő gonadális szteroid, az ösztrogén vagy a progeszteron hiányából, ezért megvizsgáltuk ennek a két hormonnak a szerepét az ERK1/2 szignálmolekula foszforilációjában. A gonadektómia-okozta változást azonban sem az ösztrogén pótlás, sem az ösztrogén és progeszteron együttes adása nem volt képes módosítani. Mivel az általunk alkalmazott ösztrogén és progeszteron kezelés jól közelíti a fiziológiásnak megfelelő hormonszint változások ciklusosságát, feltételezzük, hogy az ERK1/2 jelátviteli útvonalat nem módosítják a gonadális szteroidok a GnRH neuronokban. Ezt a feltevésünket erősíti az is, hogy az 1 órás ösztrogén kezelés szintén nem változtatta meg szignifikánsan az ERK1/2 foszforilációt, így az ösztrogénnek - legalábbis ebben az időablakban - az ERK1/2 foszforilációra kifejtett gyors hatását sem tudtuk kimutatni. Mindezek ellenére mégsem zárhatjuk ki teljesen a gonadális szteroidok ERK1/2 foszforilációt módosító szerepét ebben a folyamatban. Elképzelhető például, hogy az ERK1/2 foszforiláció dóziszfüggő, vagyis függ a hormonok aktuális, vérben mérhető koncentrációjától. A folyamatos ösztrogén kezeléssel kísérleteinkben ugyanis - a vizsgálat időpontjában - az egerekben detektálható ösztrogénszint a diösztrusz-ösztrozusz stádiumának felelt meg. Mivel az ösztrogén kezelés hatására az ERK1/2 foszforiláció, bár nem szignifikáns mértékben, de csökkenő tendenciát mutatott, ezért egy magasabb ösztrogén szinttel jellemezhető fázisban, proösztrozuszban például elképzelhető az ERK1/2 foszforiláció mértékének szignifikáns csökkenése.

Korábbi kísérletek kimutatták, hogy a gonadektómia csökkenti, az 1 órás ösztrogén kezelés pedig szignifikánsan növeli a CREB foszforilációt a GnRH neuronban (Ábrahám és mtsai, 2003). Adataink alapján tehát ez az ösztrogén-érzékeny CREB útvonal független az ERK1/2 útvonaltól, valamilyen más up-stream szignál felelős a CREB foszforilációért. Az ERK1/2 tehát olyan másodlagos jelátviteli útvonal a GnRH neuronban, mely feltehetően nem válaszol az ösztrogénre és progeszteronra, és ez alapján valószínűleg a reprodukív funkcióktól eltérő fiziológiai folyamatban játszik szerepet.

Az eredményeinkből adódó ellentmondás, miszerint az ERK1/2 szignálútvonalat nem módosítják a gonadális hormonok, ugyanakkor a gonádok hiánya növeli a GnRH idegsejtekben az ERK1/2 foszforilációt, nem feloldható. A gonádok eltávolításával ugyanis sérülnek az ovárium és a központi idegrendszer közötti idegi kapcsolatok. A

gonádok és a központi idegrendszer egyes struktúrái, például a hypothalamus közötti közvetlen összeköttetés létezése régóta ismert. Az egyik oldali ovárium műtéti eltávolítását követően biokémiai módosulások történnek az egyik oldali hypothalamusban, míg a hypothalamikus, hypothalamuson kívüli ill., különböző gerincvelői területek léziója befolyásolja az ovárium működését (Gerendai és Halász, 1997; Advis és mtsai, 1989). A petefészek motoros beidegést kap a szimpatikus rendszertől (a gerincvelő thoracalis és a lumbális szegmentumának intermediolaterális sejtszlopában elhelyezkedő preganglionáris efferens perikarionoktól) és a paraszimpatikus rendszer felől is a nervus vaguson keresztül. Emellett afferens rostok is elérik az ováriumot a szimpatikus és a paraszimpatikus rendszeren keresztül (Burden és mtsai, 1983; Klein és Burden, 1988). Az általunk megfigyelt jelenség, a gonadektómia-indukált ERK1/2 foszforiláció növekedés a GnRH neuronokban tehát az ovárium és a központi idegrendszer közötti idegi kapcsolatok sérülésének következménye is lehet.

6.II. Az immunológiai kihívás hatása az ERK1/2 foszforilációra

Kísérleteinkben a KLH-FITC oltással a T-sejt-függő humorális immunválaszt kiváltó fertőző mikroorganizmusok hatását kívántuk modellezni, mivel számos baktérium és vírus is T-sejt-függő humorális immunválaszt idéz elő a szervezetben. Kísérleteink során ennek az immunstimulusnak a hatását tanulmányoztuk a GnRH neuronok ERK1/2 szignálútjára.

6.II.1. Az immunológiai kihívás ERK1/2 foszforilációt okoz a GnRH idegsejtekben

Munkánkban kimutattuk, hogy a KLH-FITC által előidézett immunválasz késleltetett és specifikus ERK1/2 foszforiláció növekedést okoz a GnRH neuronokban.

Az ERK1/2 foszforiláció változását négy időpontban vizsgáltuk: 6 órával (akut fázis), 3 nappal (szubakut fázis), 6 nappal (krónikus fázis) és 12 nappal (szubkrónikus fázis) az immunizálás után. Vizsgálataink során elnyújtott ERK1/2 foszforiláció emelkedést tapasztaltunk: a 3. napon már jelentős mértékű emelkedést láttunk a pERK1/2 immunpozitív GnRH idegsejtek számában, mely növekedés a 6. napon érte el a maximumát, majd a 12. napra ismét az alapszinthez közeli értéket mutatott. A megfigyelt ERK1/2 foszforiláció növekedés a már expresszióra került ERK1/2 protein foszforilációs módosításának köszönhető, nem pedig genomális változásoknak, mivel ezzel egyidejűleg az ERK fehérjét expresszáló GnRH idegsejtek száma nem változott az immunstimulus hatására egyik vizsgált időpontban sem.

Vizsgálataink során arra is kíváncsiak voltunk, hogy az immunstimulust követően tapasztalt szignifikáns ERK1/2 foszforiláció növekedés a KLH-FITC antigénnel kiváltott immunválaszra adott általános válaszreakció-e az agyban vagy a GnRH neuronok sajátja. Ehhez elsőként immunizált és kontroll egerek egyes agyi régióinak pERK1/2 fehérje mennyiségét hasonlítottuk össze Western blot segítségével, majd számos elő- és köztiagyi régióban a pERK1/2 immunpozitív sejtek számát is megvizsgáltuk kvalitatív módon, immuncitokémiai elemzéssel, majd ezután néhány agyterület pontosabb, kvantitatív analízisét is elvégeztük, de sem a pERK1/2 fehérje mennyiségében, sem a pERK1/2 immunreaktív sejtek számában nem láttunk szignifikáns változást. Ezek alapján feltételezzük, hogy a KLH-FITC-cel indukált immunválasz által, ilyen időbeli lefutással kiváltott ERK1/2 foszforiláció a GnRH neuronokra jellemző jelenség az agyban.

6.II.2. Az immunológiai kihívás ERK1/2 foszforilációt kiváltó hatásának lehetséges mechanizmusa

Vizsgálataink következő részében arra kerestük a választ, hogy a KLH-FITC-cel indukált immunstimulus milyen mechanizmussal módosítja a GnRH neuronok szignalizációját, milyen faktor közvetítheti a perifériás hatást a GnRH idegsejtekhez. Mivel ismert, hogy a szisztémás bakteriális és vírusos fertőzések gyulladásos folyamatokat válthatnak ki az agyban is, mely folyamat gyulladásos citokinek termelésével, leukocita és monocita beáramlással, valamint a nyugvó mikroglia sejtek aktivációjával jellemezhető, ezért megvizsgáltuk, hogy ezek a gyulladásos faktorer, illetve sejtek valamelyike tehető-e felelőssé a GnRH idegsejtekben megfigyelt ERK1/2 foszforilációért, hiszen az agyban zajló gyulladásos folyamatok kimenetelének meghatározásában fontos szabályozási pont az ERK1/2 szignálkaskád. A perifériáról érkező immunmediátorok, vagy hatásukra az agyban termelődő immunválaszt módosító faktorer, mint a citokinek, ugyanis sok esetben az ERK1/2 útvonalat aktiválják (McCubrey és mtsai, 2000; Watson és Fan, 2005; Saud és mtsai, 2005) és ezen keresztül befolyásolják a célsejt génexpresszióját (Buzas és mtsai, 2002; Wang és mtsai, 2004), mely végül meghatározza az adott sejt immunkihívásra adott válaszreakcióját.

Elsőként az immun- és az idegrendszer közötti kapcsolatok kialakításában fontos szerepet betöltő citokinek szerepét tanulmányoztuk. Mivel a szervezet fertőzésre adott védekező válaszában a proinflammatorikus citokinek (IL-1, IL-6, TNF- α) játszókat a főszerepet, ezért megvizsgáltuk ezeknek a citokineknek a szerepét. Mivel az immunválasz során szekretált perifériás proinflammatorikus citokinek szekréciója az immunválasz korai

fázisában jellemző (Janeway és mtsai, 2001), az ERK1/2 foszforilációs változás viszont egy napok múlva megjelenő, elhúzódó hatás, ezért elsőként az agyban termelődő és ürülő proinflammatorikus citokinek szerepét valószínűsítettük. Ezért megmértük az agyszövet IL-1 β és TNF- α mennyiségét az immunizálás utáni 6. napon, vagyis abban az „időpontban”, amikor az ERK1/2 foszforiláció maximumát megfigyeltük, de nem láttunk különbséget a kontroll és az immunizált egerek agyának citokin szintjében.

A további immunmarkerek jelenlétét az agyban első lépésben hematoxylin-eozin festéssel vizsgáltuk meg (26. kiegészítő ábra, Dénes Ádám munkája). Hematoxylin-eozin festéssel sem monocita- és leukocita bevándorlást, sem egyéb gyulladásra utaló jelet - mint például kitágult ereket - nem láttunk az agyban, azokon a területeken sem, ahol GnRH neuronok találhatók. Ezt a megfigyelést erősítik az áramlási citofluorimetriával nyert adataink is, miszerint nem mutatható ki agyi T-sejt infiltráció az immunizálást követően. Mivel sem az egész agyat érintő, sem lokális, a GnRH neuronok körüli gyulladást nem tudtunk kimutatni a KLH-FITC-cel immunizált egerek agyában, ezért feltételezésünk szerint nem az agyban kialakuló gyulladásos folyamatok tehetők felelőssé a GnRH neuronokban megfigyelt ERK1/2 foszforiláció növekedésért. Ezt tovább erősítik a szintén Dénes Ádám által végzett immunhisztokémiai vizsgálatok, mely szerint nincs kimutatható különbség a két kísérleti csoport között az összes leukocitát felismerő CD45 marker és a neutrofil granulocitákat festő NIMP marker megjelenésében (a dolgozatban nem bemutatott eredmények), továbbá a mikroglia felismerő és az aktivált mikrogliaikat intenzívebben festő lectin és Iba1 markerek esetében sem, ami azt jelzi, hogy jelentős mértékű mikroglia aktiváció sincs az agyban (27. kiegészítő ábra).

Eredményeink alapján valószínűbb tehát, hogy a perifériáról érkező faktor okozza a GnRH neuronokban észlelt ERK1/2 foszforiláció növekedést. Ez megmagyarázná, hogy miért csak a GnRH neuronokban láttunk ERK1/2 foszforiláció növekedést. A GnRH neuronok jelentős része ugyanis axonjait vér-agy-gát-mentes területekre, a circumventricularis szervekhez vetíti, az OVLT és az eminentia mediana területére (Merchenthaler és mtsai, 1989; Rothfeld és mtsai, 1985), mely fajtól függően az axonok 35-90%-át (Berglund és mtsai, 1993; Merchenthaler és mtsai, 1989), egér esetében az idegsejtek 70%-át jelenti (Merchenthaler és mtsai, 1989). Így a GnRH neuronok - illetve a vér-agy-gát-mentes területekre idegvégződéseket küldő más idegsejtek is - „érzékenyebbek” lehetnek a perifériáról érkező hatásokra, mivel terminálisaik számottevő része nem rendelkezik a vér-agy-gát nyújtotta védelemmel. Így a perifériás gyulladás során keletkező és a vérben keringő gyulladásos faktorok elérhetik a GnRH idegsejteket és

közvetlenül a GnRH neuronon hathatnak. Vagyis a különféle immunkihívások hatására a periférián kialakuló gyulladás során termelődő és szekrécióra kerülő gyulladásí komponensek közvetlen hatást fejthetnek ki a GnRH neuronra. A különböző immunstimulusok azonban különböző faktorok termelését indukálják, melyek különbözőképpen aktiválhatják a GnRH idegsejteket, ami által a neuroendokrin válasz is eltérő lehet. Ez magyarázhatja, hogy a dextrán-FITC vagy a periférián szintén masszív gyulladást kiváltó CFA miért nem okoz ERK1/2 foszforilációt a GnRH idegsejteken, míg a KLH-FITC által indukált perifériás faktorok ezen az útvonalon keresztül aktiválják a GnRH neuronokat.

Említésre méltó megfigyelés az is, hogy - bár patológiás mikroglia aktivációt nem láttunk az agyban, - a GnRH neuronok fiziológias körülmények között is szoros kapcsolatban vannak a mikrogliaakkal (28. kiegészítő ábra), így az is elképzelhető, hogy a perifériás faktorok nem közvetlenül a GnRH neuronon, hanem az agyba bejutva a mikroglia hatnak, és rajtuk keresztül „érik el” a GnRH neuronokat.

Az immunválasz során megjelenő perifériás faktorok közül eddig citokin receptorok mRNS-ét mutatták ki a GnRH idegsejteken (Jasoni és mtsai, 2005), valamint nemrégiben a C5a komplement receptor expresszióját is igazolták (Farkas és mtsai, 2008). Az eddig leírtak és az irodalmi adatok alapján tehát a citokinek szerepet játszhatnak az ERK1/2 foszforiláció növekedés létrehozásában. Mivel az agyban az IL-1 β és a TNF- α mennyiségének növekedését nem tudtuk detektálni, és az agyi citokinek egyik fő forrásának, a mikrogliaának az aktivációját sem tudtuk igazolni, így a perifériás citokinek szerepét tartjuk valószínűbbnek ebben a folyamatban. A perifériás citokinek közül eddig csak a proinflammatorikus IL-1 β citokin lehetséges szerepét vizsgáltuk meg közvetett módon, a vérben jelenlévő mennyiségének mérésével, ami a KLH-FITC immunizálás után 6 órával jelentős mértékű emelkedést mutatott a kontrollhoz képest, 3, 6 és 12 napnál a különbség csökkent, de az IL-1 β szintje még emelkedett maradt (nem bemutatott megfigyelés). Az IL-1 β időbeli lefutása tehát különbözik az ERK1/2 foszforilációnál megfigyeltnél, így - bár az IL-1 β mRNS-ét kimutatták a GnRH idegsejteken (Jasoni és mtsai, 2005) - az IL-1 β közvetlen ERK1/2 foszforilációt okozó szerepe nem valószínű, ugyanakkor részt vehet foszforiláció létrehozásában, esetleg más citokinek aktivációja útján. Elképzelésünk szerint a különböző antigénnel való kihívások során megjelenő citokinmintázatok különbségei vezethetnek az idegsejtek különböző típusú aktivációjához.

Mivel a citokinek sok esetben a PGE₂ szekréció növelésével fejtik ki hatásukat az agyban (Blatteis és mtsai, 2005), azt is megvizsgáltuk, hogy a prosztaglandin E₂ szintézis gátlása befolyásolja-e az ERK1/2 foszforilációt. A PGE₂ szintézis gátlása azonban nem szüntette meg az ERK1/2 foszforiláció növekedést a GnRH idegsejtekben, így amennyiben citokinek közvetítik a perifériás hatást, nem a PGE₂ szekréció fokozásán keresztül fejt ki hatásukat.

A komplement komponenseknek szintén szerepe lehet az ERK1/2 foszforilációt létrehozó folyamatban, mivel a klasszikus komplement útvonal elemei például az immunválasz későbbi szakaszában, az immunkomplexek kialakulása után aktiválódnak (Janeway és mtsai, 2001), és a C5a receptorok révén a C5a komplement fehérje aktiválhatja a GnRH idegsejteket.

Itt érdemes megemlíteni, hogy kísérleteinkben az ERK1/2 foszforiláció maximuma abba az időintervallumba esik, amikor az ellenanyag termelése már szignifikáns növekedést mutat, ami felveti az immunválasz során termelődő IgM és/vagy IgG szerepét ebben a folyamatban. Ezt alátámasztaná az az irodalomból ismert adat, miszerint perifériás gyulladás után 1-4 héttel megnőhet a kisebb szérumfehérjék (pl. IgG, IgM, albumin) (Rabchevsky és mtsai, 1999) agyba történő „beszivárgása”, anélkül, hogy egyéb gyulladásra utaló jelet látni lehetne az agyban. Mivel azonban a GnRH neuronokon kifejeződő Fc receptorok jelenlétére vonatkozóan nincsenek adataink, és egyéb kísérletes eredmények sem támasztják alá ezt a feltevésünket, így ezzel csak egy újabb lehetséges magyarázatot kínálunk.

Annak kiderítése, hogy pontosan milyen faktor okozza a GnRH neuronokban megfigyelt jelenséget, további vizsgálatokat igényel. Ugyanakkor valószínű, hogy a fent említett komponenseknek nem egyike, hanem közülük több - egy komplex folyamat részeként - hozza létre az ERK1/2 foszforiláció növekedést a GnRH neuronokban.

6.II.3. Az immunológiai kihívás által okozott ERK1/2 foszforiláció lehetséges szerepe

Az immunológiai kihívást követően a GnRH neuronok kb. 40%-ában figyeltünk meg ERK1/2 foszforilációt, ami azt jelzi, hogy az immunstimulusra adott válasz tekintetében a GnRH idegsejtek nem képeznek egységes sejtpopulációt. Ismert, hogy a GnRH neuronok elszórt elhelyezkedésük ellenére különböző szempontok szerint funkcionális csoportokat alkotnak. Funkcionális különbözőséget jeleznek a GnRH idegsejtek génexpressziós mintázattalbeli különbségei (Pimpinelli és mtsai, 2006; Zhang és Dong, 2007), így például az ovuláció előtti LH-csúcs létrehozásában részt vevő GnRH idegsejtek c-fos-t expresszálnak

az LH-csúcs idején (Rajendren, 2001). A GnRH neuronok elektrofiziológiai válaszaiban látott különbségek szintén az eltérő funkcióval rendelkező GnRH sejtcsoportok létezését bizonyítják. Eltérő szerepüket anatómiai tulajdonságaik is meghatározhatják, attól függően, hogy sejttestjeik melyik agyterületen találhatók ill., hogy axonjaik milyen agyterületen végződnek, más funkciót tölthetnek be. A septumban és az anterior hypothalamusban található neuronok nagy része például az eminentia mediana területére vetül, és így a hypophysis elülső lebenyének hormon termelését szabályozza (Merchenthaler és mtsai, 1989). Az eminentia mediana területére vetítő GnRH neuronok tehát elsősorban neuroendokrin sejtek, míg az axonterminálisaikat az OVLT területére ill., a vér-agy-gáttal határolt hypothalamicus, illetve hypothalamuson kívüli agyterületekre küldő GnRH neuronoknak inkább a neuromodulációban bizonyított a szerepe (Rothfeld és Gross, 1985, Rajendren, 2001). Így például ezek a GnRH neuronok képesek modulálni az olfaktórikus receptor neuronok szagok iránti érzékenységet (Eisthen és mtsai, 2000). Mivel a GnRH idegsejtek az általunk megfigyelt jelenség esetében sem képeznek egységes populációt, ezért a fent leírtak miatt megvizsgáltuk az esetleges területi különbségeket. Az immunkihívás által okozott foszforilációs változásban azonban nem láttunk regionális különbségeket. A ERK1/2 fehérje foszforilációja ugyanolyan mintázatot mutatott a GnRH neuronokban, függetlenül az idegsejtek lokalizációjától (MS, OVLT/AVPV, mPOA, AH; a dolgozatban nem bemutatott eredmények). Bár retrográd jelöléses tanulmányokat nem végeztünk, de amennyiben a feltételezésünk igaz, miszerint inkább a vér-agy-gát-mentes területekre vetítő neuronokban foszforilálódik az ERK1/2 immunstimulust követően, akkor a fentiek értelmében ezek az idegsejtek az agyalapi mirigy szabályozásában és/vagy a neuromodulációban vehetnek részt. Ezenkívül az is jól ismert, hogy a gyulladási folyamatok - a GnRH ürítés inhibícióján keresztül - gátolják a reprodukció tengely működését (He és mtsai, 2003), valamint az ovariális ciklus működését is felborítja az immunstimulus (Karsch és mtsai, 2002). Ezért kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a GnRH neuronokban megfigyelt immunkihívás által kiváltott ERK1/2 foszforilációnak szerepe lehet-e a HPG tengely szabályozásában. Ehhez az ösztrusz ciklus, illetve az agyalapi mirigy elülső lebenyében termelt LH plazmában jelenlevő szintjének esetleges változásait követtük nyomon az immunizálás után. Azonban sem az ösztrusz ciklusban, sem az LH szintben nem tapasztaltunk változást a kontroll egerekhez viszonyítva. Ez alapján úgy gondoljuk, hogy a GnRH neuronokban kimutatott immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforilációnak nincs szerepe a HPG tengely hormontermelésének regulálásában. Irodalmi adatok alapján tehát elképzelhető, hogy a megfigyelt jelenségnek inkább a

reproduktív funkciókkal kapcsolatos neuromodulatív funkciókban van szerepe, mint az agyalapi mirigy elülső lebeny hormontermelésének közvetlen szabályozásában. Ugyanakkor, mivel az ERK1/2 szignálkaskád szerepe jól ismert számos sejtípus neuroprotektív folyamataiban (Cavanaugh és mtsai, 2006; Toborek és mtsai, 2007; Pernet és mtsai, 2005; Park és mtsai, 2004), és azt is tudjuk, hogy az ERK jelátviteli molekula fontos közvetítője az antiapoptotikus folyamatoknak a GnRH neuronok migrációja során (Allen és mtsai, 1999, 2002), ezért az is elképzelhető, hogy a megfigyelt ERK1/2 szignál az immunkihívás elleni védelem része, neuroprotektív szignál a GnRH neuronokban.

6.III. A gonadális szteroidok és az immunológiai kihívás interakciójának hatása a GnRH neuronok ERK1/2 foszforilációjára

6.III.1. Az ösztrogén szerepe az immunkihívás által kiváltott ERK1/2 foszforilációban

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a KLH-FITC által okozott, GnRH neuronokban megfigyelt, elnyújtott ERK1/2 foszforiláció növekedés ösztrogén-függő folyamat eredménye. Petefészekirtott egerekben ugyanis nem tudtuk detektálni az ERK1/2 foszforiláció növekedését az immunizálást követően, míg a gonadektomizált egerek ösztrogén kezelése után kimutatható volt az intakt ill., álműtött állatokban megfigyelt, immunstimulus által kiváltott szignifikáns ERK1/2 foszforiláció a GnRH idegsejtekben. Az ösztrogén hatásának pontos mechanizmusa és szerepe viszont még nyitott kérdés ebben a folyamatban. Az alábbiakban csupán két lehetséges magyarázatot kínálunk.

Az egyik lehetőség, hogy az ösztrogén a periférián fejti ki hatását, vagyis annak a perifériás immunfaktorak a keletkezéséhez szükséges, ami aztán képes kiváltani az ERK1/2 foszforilációt a GnRH neuronokban. Az irodalomból ismert, hogy az ösztrogén elsősorban a humorális immunválaszt erősíti: Th2 irányú eltolódást okoz az immunválaszban; módosítja a citokintermelést (Ito és mtsai, 2001, Salem, 2004) és növeli az ellenanyagtermelést (Kanda és Tamaki, 1999). Ez alapján elképzelhető, hogy az ösztrogén a T sejtek stimulálásával fejti ki az ERK1/2 foszforilációhoz szükséges hatását a citokinek- és/vagy az ellenanyagszint növelésén keresztül.

Egy másik lehetőség, hogy az ösztrogén centrálisan fejti ki hatását, a GnRH neuronokra hatva. Ennek egyik lehetséges módja, hogy az ösztrogén az ERK1/2 foszforilációt okozó perifériás immunfaktor receptor expressziójának fokozásán keresztül érzékenyíti a GnRH neuronokat úgy, ahogy az ösztrogén növelni képes például a C5a komplementfehérje receptorának kifejeződését a GnRH neuronokon (Farkas és mtsai, 2008). Ugyanakkor ismert az is, hogy az ösztrogén közvetlenül a mikroglia hatva

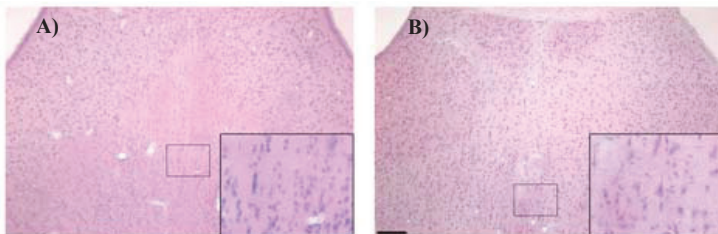
csökkenteni képes a mikroglia reaktivitását gyulladást követően (Vegeto és mtsai), vagyis esetünkben az is elképzelhető, hogy az ösztrogén a mikrogliaán keresztül közvetíti hatását a vele szoros kontaktusban lévő GnRH neuronra.

Bebizonyítottuk tehát, hogy az ösztrogén jelenléte nélkülözhetetlen a KLH-FITC-cel GnRH neuronokban kiváltott ERK1/2 foszforiláció szignifikáns növekedéséhez. Az immunválasz alatt az ösztrogén pontos hatásmechanizmusa, valamint az ERK1/2 foszforilációnak a GnRH neuronok működésében betöltött szerepe viszont még nem tisztázott. A legújabb eredmények alapján azonban tudjuk, hogy a bakteriális és virális fertőzések során az ösztrogén jelenléte elengedhetetlen a megfelelő immunválasz kialakításához nőstény egerekben (Soucy és mtsai, 2005).

Összefoglalásként, a dolgozat második részében kimutattuk, hogy a KLH-FITC antigénre adott humorális immunválasz késleltetett, specifikus és ösztrogén-függő ERK1/2 foszforiláció növekedést okoz a GnRH neuronokban. Eredményeink jelentősége, hogy adataink hozzájárulhatnak a GnRH neuronok immunológiai kihívásra adott válaszának megértéséhez, illetve közelebb vihetnek annak megértéséhez is, hogy a különböző perifériás immunstimulusok hogyan képződnek le a neuroendokrin rendszer számára.

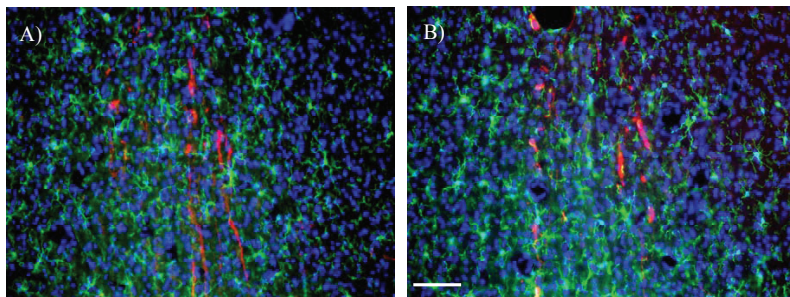
A doktori értekezésemben bemutatott kísérletek tehát megmutatták, hogy az ERK1/2 szignálkaskád az ösztrogénre és az immunológiai kihívásra egyaránt érzékeny jelátviteli útvonal az agyban, különböző hatásokra azonban különböző agyterületeken ill., sejtekben, más időbeli lefutással aktiválódik és más biológiai funkciókat befolyásol. Résztesz a nemi különbségeket mutató hálózatok modulálásában, a reprodukív funkciók és a magasabb szintű kognitív információk feldolgozásában, valamint a periférián kialakuló gyulladási folyamatok hatásainak a reprodukív tengely számára való közvetítésében is.

7. KIEGÉSZÍTŐ ÁBRÁK



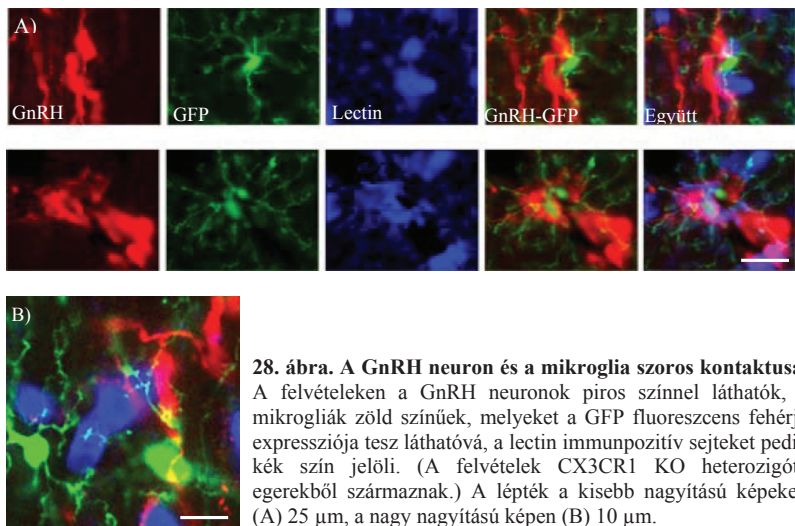
26. ábra. Hematoxylin-eosin festés kontroll és KLH-FITC-cel kezelt egerekben.

A kontroll (A) és a KLH-FITC-cel immunizált (B) egerek septumáról készített reprezentatív felvételeken látható, hogy nincs különbség a két csoport között a monocita és leukocita számban, valamint egyéb gyulladásra utaló jel (pl. kitágult ér) sem látható az agyban. A lépték 100 μm .



27. ábra. Mikroglia festés kontroll és KLH-FITC-cel kezelt egerekben.

A kontroll (A) és a KLH-FITC-cel immunizált (B) egerek septumáról készített képeken megfigyelhető, hogy a mikroglia aktiváció mértéke nem különbözik a két kísérleti csoportban. A mikrogliaikat festő Iba1 marker zöld, a GnRH neuronok piros színnel láthatók a felvételeken. A kék fluoreszcens festés a septumban található sejtek magját jelöli (DAPI nukleáris marker). A lépték 100 μm .



28. ábra. A GnRH neuron és a mikroglia szoros kontaktusa.

A felvételeken a GnRH neuronok piros színnel láthatók, a mikrogliaák zöld színűek, melyeket a GFP fluoreszcens fehérje expressziója tesz láthatóvá, a lectin immunpozitív sejteket pedig kék szín jelöli. (A felvételek CX3CR1 KO heterozigóta egerekből származnak.) A lépték a kisebb nagyítású képeken (A) 25 μm , a nagy nagyítású képen (B) 10 μm .

8. ÖSSZEFOGLALÓ

Az ERK1/2 szignálút vonal a jelátviteli hálózat egyik legősibb tagjaként alapvető fiziológiai folyamatokat szabályoz, ami által fontos és sokrétű szerepet tölt be a homeosztázis megőrzésében. Célunk az extracelluláris szignál-regulált kináz 1/2 (ERK1/2) jelátviteli út vonal működésének vizsgálata volt egér agyban 1.) a gonadális szteroid hormonok, 2.) az immunológiai kihívás és 3.) a gonadális szteroidok- immunológiai kihívás interakciójának hatására.

1.) Az ösztrogén klasszikus, a gének átírására gyakorolt közvetlen hatásai mellett, kevésbé feltárt, ún. „nem-klasszikus” hatásokat is kifejt az idegsejtekre a jelátviteli rendszereken keresztül. Jelen tanulmányunkban a gonadektómia és az ösztrogén ERK1/2 foszforilációra gyakorolt hatásait, valamint ezek nemi különbségeit vizsgáltuk meg hypothalamicus és előagyú területeken és a gonadotrop releasing hormon (GnRH) neuronokban. Kísérleteink nagymértékű nemi és területi különbségeket tártak fel az ERK1/2 foszforilációban gonadektómia és ösztrogén kezelés hatására *in vivo*. A foszforilált ERK1/2 (pERK1/2) szintje az anteroventralis periventricularis magban (AVPV) magasabb volt hímekben, mint nőstényekben függetlenül a gonadális hormonszinttől. Ezen kívül a petefészekirtás csökkentette a pERK1/2 immunreaktív sejtek számát a hímek piriformis cortexében (Pir), míg az ösztrogén növelte a pERK1/2 immunpozitív sejtek számát a mediális preopticus területen (mPOA) és az AVPV-ben nőstényekben. Nőstény egerek GnRH neuronjaiban azonban nem tudtuk az ösztrogén „nem-klasszikus” hatását kimutatni, a gonadektómia viszont szignifikánsan növelte az ERK1/2 foszforilációt.

2.) Az immunológiai kihívás a GnRH neuronok működésének gátlásával csökkentheti a reprodukciós képességet, ennek pontos mechanizmusa azonban nem ismert, így a kövekezőkben arra kerestük a választ, hogy az immunstimulus módosíthatja-e a GnRH idegsejtek ERK1/2 jelátviteli út vonalának működését. Kísérleteink során megmutattuk, hogy a KLH-FITC által előidézett perifériás T-sejt-függő antigénre adott humorális immunválasz (immunológiai kihívás) késleltetett és a GnRH neuronokra jellemző jelentős ERK1/2 foszforiláció növekedést okoz nőstény egerekben *in vivo*.

3.) Kimutattuk továbbá azt is, hogy az ösztrogén nélkülözhetetlen a GnRH neuronokban megfigyelt immunstimulus-indukált ERK1/2 foszforiláció létrejöttében.

9. SUMMARY

The ERK1/2 signaling pathway is one of the most ancient members of the signaling network which regulates basic physiological processes, and has an important and diverse role in the maintenance of homeostasis. Our aim was to investigate the actions of the ERK1/2 signaling cascade in mouse brain to the effects of 1.) gonadal steroids, 2.) immune-challenge and 3.) gonadal steroids-immune-challenge interaction.

1.) In addition to the classical direct genomic mechanisms of action, estrogen also exerts poorly understood, “nonclassical effects” on the signaling system in neurons. In the present study we examined whether sex differences exist in gonadectomy- and estrogen-induced effects on ERK1/2 phosphorylation in hypothalamic and forebrain regions, and in the gonadotropin releasing hormone neurons (GnRH) of mice. Our results demonstrate a marked sex difference between the gonadectomy- and estrogen-induced alterations of ERK1/2 phosphorylation in the mouse brain *in vivo*. We showed that the level of phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) within the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) was consistently higher in males than females irrespective of gonadal steroid hormone status. In addition, gonadectomy was found to decrease pERK1/2 immunoreactivity within the piriform cortex (Pir) of males, while estrogen increased pERK1/2 immunoreactivity in the medial preoptic area (mPOA) and AVPV of females. In GnRH neurons of female mice, however, we failed to show the “nonclassical effects” of estrogen, but gonadectomy significantly increased ERK1/2 phosphorylation.

2.) Immune-challenges can disrupt reproductive capability by inducing changes in the activity of GnRH neurons. The precise molecular mechanism of this effect is, however, unknown. Thus in our experiments we studied how the immune-challenge can alter the function of ERK1/2 signaling in GnRH neurons. We demonstrated that the KLH-FITC-induced peripheral T-cell dependent humoral immune response (immune-challenge) caused a massive, delayed and GnRH neuron-specific increase of ERK1/2 phosphorylation in female mice *in vivo*.

3.) We also showed that estrogen is required for the immune-challenge-induced ERK1/2 phosphorylation in GnRH neurons.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni **Dr. Juhász Gábornak**, hogy a kutatócsoportjában dolgozhattam, és közvetlen témavezetőmnek **Dr. Ábrahám Istvánnak**, hogy munkám során szakmailag és emberileg egyaránt támogatott és ezzel nagymértékben hozzájárult az eredmények megszületéséhez. Ezenkívül köszönettel tartozom azért, hogy az idegtudomány számos elméleti és gyakorlati kérdését ismerhettem meg az itt eltöltött évek során.

Dr. Szilágyi Nórának a felmerülő statisztikai problémákban nyújtott segítségét szeretném megköszönni.

Köszönettel tartozom továbbá közvetlen munkatársaimnak, **BaracsKay Péternek**, **Dr. Batáryné Szegő Évának**, **Kaszás Attilának**, **Dr. Kékesi Katalinnak**, **Dr. Lőrincz Magornak**, **Mórotz Gábornak**, **Nyilas Ritának**, **Oláh Mártának**, **Orbán Gergőnek**, **Rauscher Annának**, **Slézia Andreának**, **Szepesi Zsuzsának** és **Takács Eszternek**, akik nemcsak a munkámban segítettek, de köztük nagyon jó barátokat is találtam, és olyan légkört teremtettek, melyben öröm volt dolgozni.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Sármai Gabriellának** mindazért a szakmai segítségért, melyet a munkacsoportjával végzett kollaborációs munka során nyújtott. Köszönöm **Barad Zsuzsannának** - akivel a kollaborációs munka zömét együtt végeztük - a kísérletek és a dolgozat megírása során adott nagyon hasznos, építő kritikáit. Köszönöm **Ádori Mónikának** az ELISA mérésekben és **Kiss Endrének** a FACS-os mérésekben nyújtott segítségét, valamint köszönet a **Jelátviteli Laboratórium valamennyi munkatársának**, akik sokat segítettek a mindennapok során jelentkező immunológiai problémák megoldásában.

Dr. Nagy Györgynek és munkacsoportjának a radioimmunoassay mérések elvégzéséért szeretnék köszönetet mondani.

Továbbá köszönöm **Dr. Dénes Ádámnak** az eredményeimet támogató kísérletek kivitelezését és mindazt a hasznos tanácsot, melyet mind a kísérletek, mind a dolgozat megírása során adott.

Külön szeretném megköszönni jelenlegi témavezetőmnek, **Dr. Harkány Tibornak**, valamint **Penz Orsolyának**, hogy lehetővé tették és segítették a doktori értekezésem befejezését.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom **családomnak és barátaimnak**, akik érdeklődésükkel és támogatásukkal mindvégig segítettek munkámat.

11. IRODALOMJEGYZÉK

1. Abraham IM, Han S-K, Todman MG, Korach KS, Herbison AE. Estrogen receptor- β mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J. Neurosci.* 2003; 23:5771-5777.
2. Abraham IM, Todman MG, Korach KS, Herbison AE. Critical in vivo roles for classical estrogen receptors in rapid estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain. *Endocrinology.* 2004; 145:3055-61.
3. Abraham IM and Herbison AE. Major sex differences in non-genomic estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain in vivo. *Neuroscience.* 2005; 131:945-51.
4. Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P, Marino M. S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochem and Biophys Res Comm.* 2004; 316:878-83.
5. Acosta-Martinez M, Gonzalez-Flores O, Etgen AM. The role of progestin receptors and the mitogen-activated protein kinase pathway in delta opioid receptor facilitation of female reproductive behaviors. *Horm Behav.* 2006; 49: 458-462.
6. Advis JP, Ahmed CE, Ojeda SR. Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) levels in developing ovary. *Brain Res Bull.* 1989; 22:605-10.
7. Allen MP, Zeng C, Schneider K, Xiong X, Meintzer MK, Bellosta P, Basilico C, Varnum B, Heidenreich KA, Wierman ME. Growth arrest-specific gene 6 (Gas6)/adhesion related kinase (Ark) signaling promotes gonadotropin-releasing hormone neuronal survival via extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt. *Mol Endocrinol.* 1999; 13:191-201.
8. Allen MP, Xu M, Linseman DA, Pawlowski JE, Bokoch GM, Heidenreich KA, Wierman ME. Adhesion-related kinase repression of gonadotropin-releasing hormone gene expression requires Rac activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277:38133-40.
9. Auger AP, Perrot-Sinal TS, Auger CJ, Ekas LA, Tetel MJ, McCarthy MM. Expression of the nuclear receptor coactivator, cAMP response element-binding protein, is sexually dimorphic and modulates sexual differentiation of neonatal rat brain. *Endocrinology.* 2002; 143:3009-16.
10. Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK, Kumar R. Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Lett.* 2004; 567:243-47.
11. Banks WA, Kastin AJ. Permeability of the blood-brain barrier to neuropeptides: the case for penetration. *Psychoneuroendocrinology.* 1985; 10:385-99.

12. Bengtsson S, Berglund H, Gulyas B, Cohen E, Savic I. Brain activation during odor perception in males and females. *Neuroreport*. 2001; 12:2027–2033.
13. Ben-Hur H, Mor G, Insler V, Blickstein I, Amir-Zaltsman Y, Sharp A, Globerson A, Kohen F. Menopause is associated with a significant increase in blood monocyte number and a relative decrease in the expression of estrogen receptors in human peripheral monocytes. *Am J Reprod Immunol*. 1995; 34:363-9.
14. Berglund LA, Sisk CL. Luteinizing hormone-releasing hormone neurons which are retrogradely labeled after peripheral fluoro-gold administration in the male ferret. *J Neuroendocrinol*. 1993; 4:743–749.
15. Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science*. 1987; 238:524-6.
16. Bernabeu R, Di Scala G, Zwiller J. Odor regulates the expression of the mitogen-activated protein kinase phosphatase gene hVH-5 in bilateral entorhinal cortex-lesioned rats. *Brain Res Mol*. 2000; 75: 113–120.
17. Bernardes-Silva M, Anthony DC, Issekutz AC, Perry VH. Recruitment of neutrophils across the blood-brain barrier: the role of E- and P-selectins. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; 21:1115-24.
18. Besedovsky HO, Sorkin E, Felix D, Haas H. Hypothalamic changes during the immune response. *Eur J Immunol*. 1977; 7:323-25.
19. Besedovsky HO, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*. 1986; 233:652-54.
20. Blalock JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev*. 1989; 69:1-32.
21. Blalock JE. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;741:292-8.
22. Blatteis CM, Li S, Li Z, Feleder C, Perlik V. Cytokines, PGE2 and endotoxic fever: a re-assessment. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2005; 76:1-18.
23. Bonavera JJ, Kalra SP, Kalra PS. Mode of action of interleukin-1 in suppression of pituitary LH release in castrated male rats. *Brain Res*.1993; 612:1-8.
24. Boonyaratnakornkit V, Edwards DP. Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem*. 2004; 40:105-20.
25. Boulware MI, Kordasiewicz H, Mermelstein PG. Caveolin proteins are essential for distinct effects of membrane estrogen receptors in neurons. *J Neurosci*. 2007; 27:9941-50.

26. Breen KM, Karsch FJ. New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. *Front Neuroendocrinol.* 2006; 27:233-45.
27. Bryant DN, Bosch MA, Ronnekleiv OK, Dorsa DM. 17-Beta estradiol rapidly enhances extracellular signal-regulated kinase 2 phosphorylation in the rat brain. *Neuroscience.* 2005; 133: 343–352.
28. Bulayeva NN, Gametchu B, Watson CS. Quantitative measurement of estrogen-induced ERK 1 and 2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Steroids.* 2004; 69: 181–192.
29. Burden HW, Leonard M, Smith CP, Lawrence IE Jr. The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *Anat Rec.* 1983; 207:623-27.
30. Buzas B, Rosenberger J, Kim KW, Cox BM. Inflammatory mediators increase the expression of nociceptin/orphanin FQ in rat astrocytes in culture. *Glia.* 2002; 39:237-46.
31. Cano G, Sved AF, Rinaman L, Rabin BS, Card JP. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing. *J Comp Neurol.* 2001; 439:1-18.
32. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics.* 1997; 45:607-17.
33. Cavanaugh JE, Jaumotte JD, Lakoski JM, Zigmond MJ. Neuroprotective role of ERK1/2 and ERK5 in a dopaminergic cell line under basal conditions and in response to oxidative stress. *J Neurosci Res.* 2006; 84:1367-75.
34. Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RGW, Mendelshon Me, Shaul PW. ER beta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol.* 2002; 16:938-46.
35. Chen HF, Jeung EB, Stephenson M, Leung PC. Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84:743-50.
36. Chen RE, Thorner J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773:1311-40.
37. Ching S, He L, Lai W, Quan N. IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocytes into the central nervous system. *Brain Behav Immun.* 2005; 19:127-37.
38. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med.* 1998; 339:285-91.

39. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA. *J Biol Chem.* 1997; 272:18858-62.
40. Crosio C, Heitz E, Allis CD, Borrelli E, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and neuronal response: multiple signaling pathways induce specific histone H3 modifications and early gene expression in hippocampal neurons. *J Cell Sci.* 2003; 116: 4905–4914.
41. Cutolo M, Wilder RL. Rheum Dis Clin North Am. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am.* 2000; 26:825-39.
42. Czlonkowska A, Ciesielska A, Joniec I. Influence of estrogens on neurodegenerative processes. *Med Sci Monit* 2003; 9:247-56.
43. Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. Neural inhibition of inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Endotoxin Res.* 2003; 9:409-13.
44. Dantzer R, Bluthé RM, Layé S, Bret-Dibat JL, Parnet P, Kelley KW. Cytokines and sickness behavior. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 840:586-90.
45. Da Silva JA, Spector TD The role of pregnancy in the course and aetiology of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 1992; 11:189-94.
46. Davis EC, Shryne JE, Gorski RA. Structural sexual dimorphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. *Neuroendocrinology.* 1996; 63: 142–148.
47. Deak M, Clifton AD, Lucocq JM, Alessi DR. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 1998, 17:4426–41.
48. Denes A, Boldogkoi Z, Uhreczky G, Hornyák A, Rusvai M, Palkovits M, Kovács KJ. Central autonomic control of the bone marrow: multisynaptic tract tracing by recombinant pseudorabies virus. *Neuroscience.* 2005; 134:947-63.
49. Deng X, Ruvolo P, Carr B, May WS Jr. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:1578-83.
50. Dhandapani KM, Brann DW. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol.* 2007; 42:70-5.
51. Dimayuga FO, Reed JL, Carnero GA, Wang C, Dimayuga ER, Dimayuga VM, Perger A, Wilson ME, Keller JN, Bruce-Keller AJ. Estrogen and brain inflammation: effects on microglial expression of MHC, costimulatory molecules and cytokines. *J Neuroimmunol.* 2005; 161:123-36.

52. Dominguez R, Jalali C, de Lacalle S. Morphological effects of estrogen on cholinergic neurons in vitro involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci* 2004; 24:982-90.
53. Dudley CA, Chakravarty S, Barnea A. Female odors lead to rapid activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in neurons of the vomeronasal system. *Brain Res.* 2001; 915: 32–46.
54. Eisthen HL, Delay RJ, Wirsig-Wiechmann CR, Dionne VE. Neuromodulatory effects of gonadotropin releasing hormone on olfactory receptor neurons. *J Neurosci.* 2000; 20:3947-55.
55. Elenkov IJ, Hoffman J, Wilder RL. Does differential neuroendocrine control of cytokine production govern the expression of autoimmune diseases in pregnancy and the postpartum period? *Mol Med Today.* 1997; 3:379-83.
56. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:595-638.
57. Engler KL, Rudd ML, Ryan JJ, Stewart JK, Fischer-Stenger K. Autocrine actions of macrophage-derived catecholamines on interleukin-1 beta. *J Neuroimmunol.* 2005; 160:87-91.
58. Evinger AJ 3rd, Levin ER. Requirements for estrogen receptor alpha membrane localization and function. *Steroids.* 2005; 70:361-63.
59. Fagarasan S, Honjo T. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science.* 2000; 290:89-92.
60. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones-a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:513-55.
61. Farkas I, Varju P, Szabo E, Hrabovszky E, Okada N, Okada H, Liposits Z. Estrogen enhances expression of the complement C5a receptor and the C5a-agonist evoked calcium influx in hormone secreting neurons of the hypothalamus. *Neurochem Int.* 2008; 52:846-56.
62. Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS, Olschowki JA, Livnat S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev.* 1987; 100:225-60.
63. Felten SY, Olschowka J. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals form synapticlike contacts on lymphocytes in the splenic white pulp. *J Neurosci Res.* 1987; 18:37-48.
64. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton Jr, AR. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G-protein-coupled receptor homolog, GPR30, and

occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol.* 2000; 14:1649-60.

65. Flanagan-Cato LM. Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry. *Front Neuroendocrinol.* 2000; 21:309–329.
66. Fleshner M, Goehler LE, Hermann J, Relton JK, Maier SF, Watkins LR. Interleukin 1- β induced corticosterone elevation and hypothalamic NE depletion is vagally mediated. *Brain Res Bull.* 1995; 37:605-10.
67. Fontana A, Grob PJ. Astrocyte-derived interleukin-1-like factors. *Lymphokine Res.* 1984; 3:11-6.
68. Gazzaley A, Kay S, Benson DL. Dendritic spine plasticity in hippocampus. *Neuroscience.* 2002; 111:853-62.
69. Gerendai I, Halász B. Neuroendocrine asymmetry. *Front Neuroendocrinol.* 1997; 18:354-81.
70. Gergely J, Erdei A, Rajnavölgyi É, László G, Sármay G. Immunbiológia. 1998; Budapest, Medicina Könyvkiadó
71. Gilmore W, Weiner LP, Correale J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol.* 1997; 158:446-51.
72. Giovannini MG. The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in memory encoding. *Rev Neurosci.* 2006; 17:619-34.
73. Giulian D, Baker TJ, Shih LC, Lachman LB. Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med.* 1986; 164:594-604.
74. Goehler LE, Relton JK, Dripss D, Kiechle R, Tartaglia N, Maier SF, Watkins LR. Vagal paraganglia bind biotinylated interleukin-1 receptor antagonist: a possible mechanisms for immune-to-brain communication. *Brain Res Bull.* 1997; 43:357-64.
75. Goehler LE, Gaykema RP, Hansen MK, Anderson K, Maier SF, Watkins LR. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. *Auton Neurosci.* 2000; 85:49-59.
76. Gomperts BD, Tatham PER, Kramer IM. Signal Transduction. Academic Press, 2002.
77. Goodenough S, Engert S, Behl C. Testosterone stimulates rapid secretory amyloid precursor protein release from rat hypothalamic cells via the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Neurosci Lett.* 2000; 296: 49–52.

78. Gu G, Rojo AA, Zee MC, Yu J, Simerly RB. Hormonal regulation of CREB phosphorylation in the anteroventral periventricular nucleus. *J Neurosci.* 1996; 16:3035-3044.
79. Guerra B, Díaz M, Alonso R, Marin R. Plasma membrane oestrogen receptor mediates neuroprotection against beta-amyloid toxicity through activation of Raf-1/MEK/ERK cascade in septal-derived cholinergic SN56 cells. *J Neurochem.* 2004; 91:99-109.
80. Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol.* 1993; 47:169-76.
81. Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ. Blood-borne interleukin-1 receptor antagonist crosses the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol.* 1994; 55:153-60.
82. Harbour DV, Smith EM, Blalock JE. Splenic lymphocyte production of an endorphin during endotoxic shock. *Brain Behav Immun.* 1987; 1:123-33.
83. Hattori N, Inagaki C. Immunological aspects of human growth hormone and prolactin. *Domest Anim Endocrinol.* 1998; 15:371-5.
84. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Kanzaki T, Murata Y. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res.* 2000; 60:5988-94.
85. Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev.* 1998; 19:302-330.
86. Herbison AE, Pape JR. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Front Neuroendocrinol.* 2001; 4:292-308.
87. Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszan T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. Detection of estrogen receptor- β messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology.* 2000; 141:3506-9.
88. Hrabovszky E, Steinhäuser A, Barabas K, Shughrue PJ, Petersen SL, Merchenthaler I, Liposits Z. Estrogen receptor- β immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology.* 2001; 142:3261-64.
89. He D, Sato I, Kimura F, Akema T. Lipopolysaccharide inhibits luteinizing hormone release through interaction with opioid and excitatory amino acid inputs to gonadotropin-releasing hormone neurones in female rats: possible evidence for a common mechanism involved in infection and immobilization stress. *J Neuroendocrinol.* 2003; 15:559-63.

90. Ho GJ, Drego R, Hakimian E, Masliah E. Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4:247-56.
91. Hori T, Katafuchi T, Take S, Shimizu N, Nijima A. The autonomic nervous system as a communication channel between the brain and the immune system. *Neuroimmunomodulation*. 1995; 2:203-15.
92. Igaz P, Salvi R, Rey JP, Glauser M, Pralong FP, Gaillard RC. Effects of cytokines on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in primary hypothalamic neurons and in GnRH neurons immortalized conditionally. *Endocrinology*. 2006; 147:1037-43.
93. Imbe H, Okamoto K, Okamura T, Kumabe S, Nakatsuka M, Aikawa F, Iwai-Liao Y, Senba E. Effects of peripheral inflammation on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla. *Brain Res*. 2005; 1063:151-8.
94. Ito A, Bebo BF, Matejuk A, Zamora A, Silverman M, Fyfe-Johnson A, Offner H. Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol*. 2001; 167:542-52.
95. Jasoni CL, Todman MG, Han SK, Herbison AE. Expression of mRNAs encoding receptors that mediate stress signals in gonadotropin-releasing hormone neurons of the mouse. *Neuroendocrinology*. 2005; 82:320-8.
96. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology. 2001, 5. kiadás, Garland Science Könyvkiadó
97. Jara JH, Singh BB, Floden AM, Combs CK. Tumor necrosis factor alpha stimulates NMDA receptor activity in mouse cortical neurons resulting in ERK-dependent death. *J Neurochem*. 2007; 100:1407-20.
98. Jiang CL, Lu CL, Liu XY. The molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Domest Anim Endocrinol*. 1998; 15:363-9.
99. Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML, Coen CW. Oestrogen receptor- β immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurons: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol*. 2001; 13:741-48.
100. Kanda N, Tamaki K. Estrogen enhances immunoglobulin production by human PBMCs. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103:282-8.
101. Karen PW, Restall CJ, Brain PF. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sci*. 2000; 67:743-57.
102. Karsch FJ, Battaglia DF, Breen KM, Debus N, Harris TG. Mechanisms for ovarian cycle disruption by immune/inflammatory stress. *Stress*. 2002; 5(2):101-12.

103. Kartha KN, Ramakrishna T. The role of sexually dimorphic medial preoptic area of the hypothalamus in the sexual behaviour of male and female rats. *Physiol Res*. 1996; 45: 459–466.
104. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 1995; 270:1491-94.
105. Kawashima I, Seiki K, Sakabe K, Ihara S, Akatsuka A, Katsumata Y. Localization of estrogen receptors and estrogen receptor-mRNA in female mouse thymus. *Thymus*. 1992; 20:115-21.
106. Kelleher RJ, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S. Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*. 2004; 116:467-79 .
107. Kelly MJ, Moss RL, Dudley CA. The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity throughout the estrous cycle of the female rat. *Exp Brain Res*. 1977; 30:53-64.
108. Klein CM, Burden HW. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the ovary. *Neurosci Lett*. 1988; 85:217-22.
109. Knauf U, Tschopp C, Gram H. Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Mol Cell Biol*. 2001; 21:5500-11.
110. Kohno M, Pouyssegur J. Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med*. 2006; 38: 200-11.
111. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. Nongenotropic, sex-nonspecific signalling through estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 2001; 104:719-30.
112. Kovacs WJ, Olsen NJ. Androgen receptors in human thymocytes. *J Immunol*. 1987; 139:490-3.
113. Kregge JH, Hodgins JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Magler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson J-A, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95:15677-82.
114. Kudwa AE, Gustafsson JA, Rissman EF. Estrogen receptor beta modulates estradiol induction of progesterone receptor immunoreactivity in male, but not in female, mouse medial preoptic area. *Endocrinology*. 2004; 145:4500–4506.

115. Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93:5935-30.
116. Lagrange AH, Rønnekleiv OK, Kelly MJ. Estradiol-17 beta and mu-opioid peptides rapidly hyperpolarize GnRH neurons: a cellular mechanism of negative feedback? *Endocrinology.* 1995; 136:2341-4.
117. Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol.* 2004; 113:224-30.
118. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem.* 1996; 271:20608-16.
119. Laye S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994; 27:157-62.
120. Lee SJ, McEwen BS. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41:569-91.
121. Li L, Haynes MP, Bender JR. Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100:4807-12.
122. Li PA, He QP, Yi-Bing O, Hu BR, Siesjö BK. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase after transient cerebral ischemia in hyperglycaemic rats. *Neurobiol Dis.* 2001; 8: 127-135.
123. Lolait SJ, Lim AT, Toh BH, Funder JW. Immunoreactive beta-endorphin in a subpopulation of mouse spleen macrophages. *J Clin Invest.* 1984; 73:277-80.
124. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 2006; 147 Suppl 1:S232-40.
125. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science.* 1981; 211: 1294-1302.
126. Madden KS, Felten DL. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol Rev.* 1995; 75:77-106.
127. Madden KS, Sanders VM, Felten DL. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995; 35:417-48.
128. Madden KS. Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity. *Brain Behav Immun.* 2003; 17:S5-10.

129. Madeira MD, Leal S, Paula-Barbosa MM. Stereological evaluation and Golgi study of the sexual dimorphisms in the volume, cell numbers, and cell size in the medial preoptic nucleus of the rat. *J Neurocytol.* 1999; 28:131-48.
130. Mahesh VB, Dhandapani KM, Brann DW. Role of astrocytes in reproduction and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol.* 2006; 246:1-9.
131. Malyala A, Kelly MJ, Rønnekleiv OK. Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids.* 2005; 70:397-406.
132. Marchetti B, Guarcello V, Morale MC, Bartoloni G, Farinella Z, Cordaro S, Scapagnini U. Luteinizing hormone-releasing hormone-binding sites in the rat thymus: characteristics and biological function. *Endocrinology.* 1989; 125:1025-36.
133. Marvel FA, Chen C, Badr N, Gaykema RPA, Goehler LE. Reversible inactivation of the dorsal vagal complex blocks lipopolysaccharide-induced social withdrawal and c-Fos expression in central autonomic nuclei. *Brain Behav Immun.* 2004; 18:123-34.
134. McCubrey JA, May WS, Duronio V, Mufson A. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia.* 2000; 14:9-21.
135. McKenna NJ, O'Malley BW. From ligand to response: generating diversity in nuclear receptor coregulator function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 74:351-56.
136. Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 2007; 54:34-66.
137. Merchenthaler I, Sétáló G, Petrusz P, Negro-Vilar A, Flerkó B. Identification of hypophysiotropic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons by combined retrograde labeling and immunocytochemistry. *Exp Clin Endocrinol.* 1989; 94:133-40.
138. Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* 2000; 19:5406-17.
139. Minghetti L, Walsh DT, Levi G, Perry VH. In vivo expression of cyclooxygenase-2 in rat brain following intraparenchymal injection of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999; 58:1184-91.
140. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004; 63:901-10.
141. Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE. Immunolocalization of

- estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. 2003; 144:2055-67.
142. Mitsushima D, Tin-Tin-Win-Shwe Kimura F. Sexual dimorphism in the GABAergic control of gonadotropin release in intact rats. *Neurosci Res*. 2003; 46: 399–405.
 143. Mor G, Sapi E, Abrahams VM, Rutherford T, Song J, Hao XY, Muzaffar S, Kohen F. Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes. *J Immunol*. 2003; 170:114-22.
 144. Morale MC, Gallo F, Tirolo C, Testa N, Caniglia S, Marletta N, Spina-Purrello V, Avola R, Caucci F, Tomasi P, Delitala G, Barden N, Marchetti B. Neuroendocrine-immune (NEI) circuitry from neuron-glia interactions to function: Focus on gender and HPA-HPG interactions on early programming of the NEI system. *Immunol Cell Biol*. 2001; 79:400-17.
 145. Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol Neurobiol*. 2001; 23:1-19.
 146. Nussey, S.S. and Whitehead, S.A. *Endocrinology: An Integrated Approach*, 2001, London: Taylor & Francis.
 147. O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch, KR, Heng HH, Kolakowski LF Jr., George SR. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*. 1998; 47:310-13.
 148. Orikasa C, Kondo Y, Hayashi S, McEwen BS, Sakuma Y. Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinising hormone surge. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 3306–3311.
 149. Owman C, Blay P, Nilsson C, Lolait SJ. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem and Biophys Res Comm*. 1996; 228:285-92.
 150. Paech K, WebbP, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP-1 sites. *Science*. 1997; 277:1508-10.
 151. Park EM, Joh TH, Volpe BT, Chu CK, Song G, Cho S. A neuroprotective role of extracellular signal-regulated kinase in N-acetyl-O-methyl dopamine-treated hippocampal neurons after exposure to in vitro and in vivo ischemia. *Neuroscience*. 2004; 123:147-54.
 152. Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med*. 2003; 9:125-34.

153. Paxinos G, Franklin KBJ, The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, CA: Academic Press, 2001.
154. Pedemonte E, Mancardi G, Giunti D, Corcione A, Benvenuto F, Pistoia V, Uccelli A. Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases. *Pharmacol Ther.* 2006; 111:555-66.
155. Pernet V, Hauswirth WW, Di Polo A. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mediates survival, but not axon regeneration, of adult injured central nervous system neurons in vivo. *J. Neurochem.* 2005; 93:72-83.
156. Perrot-Sinal TS, Davis AM, McCarthy MM. Developmental sex differences in glutamic acid decarboxylase (GAD) and the housekeeping gene, GAPDH. *Brain Res.* 2001; 922: 201–208.
157. Persons DL, Yazlovitskaya EM, Pelling JC. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J Biol Chem.* 2000; 275:35778-85.
158. Petri M, Howard D, Repke J. Frequency of lupus flare in pregnancy. The Hopkins Lupus Pregnancy Center experience. *Arthritis Rheum.* 1991; 34:1538-45.
159. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. Mouse estrogen receptor- β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor- α . *Mol Endocrinol.* 1997; 11:1486-96.
160. Pietras RJ, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature.* 1977; 265:69-72.
161. Pimpinelli F, Parenti M, Guzzi F, Piva F, Hokfelt T, Maggi R. Presence of delta opioid receptors on a subset of hypothalamic gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons. *Brain Res.* 2006; 1070:15-23.
162. Pollak L, Hanoch T, Rabey MJ, Seger R. Infectious inflammation of the CNS involves activation of mitogen-activated protein kinase and AKT proteins in CSF in humans. *Neurol Sci.* 2005; 26:324-9.
163. Pozzi S, Benedusi V, Maggi A, Vegeto E. Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1089:302-23.
164. Proescholdt MG, Chakravarty S, Foster JA, Foti SB, Briley EM, Herkenham M. Intracerebroventricular but not intravenous interleukin-1 β induces widespread vascular-mediated leukocyte infiltration and immune signal mRNA expression followed by brain-wide glial activation. *Neuroscience.* 2002; 112:731-49.
165. Rabchevsky AG, Degos JD, Dreyfus PA. Peripheral injections of Freund's adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis. *Brain Res.* 1999; 832:84-96.

166. Rajendren G. Subsets of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons are activated during a steroid-induced luteinizing hormone surge and mating in mice: a combined retrograde tracing double immunohistochemical study. *Brain Res.* 2001; 918:74-9.
167. Razandi M, Pedram A, Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors signal to anti-apoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol.* 2000; 14:1434-47.
168. Refojo D, Arias P, Moguilevsky JA, Feleder C. Effect of bacterial endotoxin on in vivo pulsatile gonadotropin secretion in adult male rats. *Neuroendocrinology.* 1998; 67:275-81.
169. Ren X, Mody I. Gamma-hydroxybutyrate reduces mitogen-activated protein kinase phosphorylation via GABA B receptor activation in mouse frontal cortex and hippocampus. *J Biol Chem.* 2003; 278: 42006–42011.
170. Rettori V, Gimeno MF, Karara A, Gonzalez MC, McCann SM. Interleukin 1 alpha inhibits prostaglandin E2 release to suppress pulsatile release of luteinizing hormone but not follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:2763-7.
171. Rivest S, Lee S, Attardi B, Rivier C. The chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1 beta alters the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of cycling rats. I. Effect on LHRH and gonadotropin biosynthesis and secretion. *Endocrinology.* 1993; 133:2424-30.
172. Rivier C, Vale W. In the rat, interleukin-1 alpha acts at the level of the brain and the gonads to interfere with gonadotropin and sex steroid secretion. *Endocrinology.* 1989; 124:2105-9.
173. Rivier C, Vale W. Cytokines act within the brain to inhibit luteinizing hormone secretion and ovulation in the rat. *Endocrinology.* 1990; 127:849-56.
174. Rothfeld JM, Gross DS. Gonadotropin-releasing hormone within the organum vasculosum lamina terminalis in the ovariectomized, estrogen/progesterone-treated rat: a quantitative immunocytochemical study using image analysis. *Brain Res.* 1985; 338:309-15.
175. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68: 320-44.
176. Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, Tracey KJ, Al-Abed Y, Metz CN. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *J Exp Med.* 2005; 201:1113-23.
177. Salem ML. Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2004; 3:97-104.

178. Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*. 1987; 238:522-4.
179. Saud K, Herrera-Molina R, Von Bernhardt R. Pro- and anti-inflammatory cytokines regulate the ERK pathway: implication of the timing for the activation of microglial cells. *Neurotox Res*. 2005; 8:277-87.
180. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: A stimulus-induced transcription factor activated by diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem* 1999; 68:821-861.
181. Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I. Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology*. 1998; 139:5267-5270.
182. Simerly RB Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci*. 2002; 25:507-536.
183. Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci*. 1999; 19:2455-63.
184. Singh M. Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine*. 2001; 14: 407-415.
185. Skynner MJ, Sim JS, Herbison AE. Detection of estrogen receptor α and β messenger ribonucleic acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 1999; 140:5195-201.
186. Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol*. 2002; 16:116-27.
187. Soucy G, Boivin G, Labrie F, Rivest S. Estradiol is required for a proper immune response to bacterial and viral pathogens in the female brain. *J Immunol*. 2005; 174:6391-8.
188. Stevens-Felten SY, Bellinger DL. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs. *Chem Immunol*. 1997; 69:99-131.
189. Suenaga R, Evans MJ, Mitamura K, Rider V, Abdou NI. Peripheral blood T cells and monocytes and B cell lines derived from patients with lupus express estrogen receptor transcripts similar to those of normal cells. *J Rheumatol*. 1998; 25:1305-12.
190. Sweatt JD. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2004; 14:311-7.

191. Takada Y, Kato C, Kondo S, Korenaga R, Ando J. Cloning of cDNAs encoding G-protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem and Biophys Res Comm.* 1997; 240:737-41.
192. Takenaka H, Maruo S, Yamamoto N, Wysocka M, Ono S, Kobayashi M, Yagita H, Okumura K, Hamaoka T, Trinchieri G, Fujiwara H. Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. *J Leukoc Biol.* 1997; 61:80-7.
193. Tanriverdi F, Silveira LFG, MacColl GS, Bouloux PM. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis: immune function and autoimmunity. *J Endocrinol.* 2003; 176:293-304.
194. Tetel MJ. Nuclear receptor coactivators in neuroendocrine function. *J Neuroendocrinol.* 2000; 12:927-32.
195. Thomas GM, Huganir RL. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5:173-83.
196. Tin-Tin-Win-Shwe, Mitsushima D, Shinohara K, Kimura F. Sexual dimorphism of GABA release in the medial preoptic area and luteinising hormone release in gonadectomized estrogen-primed rats. *Neuroscience.* 2004; 127: 243–250.
197. Toborek M, Son KW, Pudielko A, King-Pospisil K, Wylegala E, Malecki A. ERK 1/2 signaling pathway is involved in nicotine-mediated neuroprotection in spinal cord neurons. *J Cell Biochem.* 2007; 100:279-92.
198. Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES, Nethrapalli IS, Tinnikov AA. ER-X: A novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci.* 2002; 22(19):8391–401.
199. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002; 420:853-9.
200. Trotter RN, Stornetta RL, Guyenet PG, Roberts MR. Transneuronal mapping of the CNS network controlling sympathetic outflow to the rat thymus. *Auton Neurosci.* 2007; 131:9-20.
201. Valentine JE, Kalkoven E, White R, Hoare S, Parker MG. Mutations in the estrogen receptor ligand binding domain discriminate between hormone-dependent transactivation and transrepression. *J Biol Chem.* 2000; 275:25322-29.
202. Van Eldik LJ, Thompson WL, Ralay Ranaivo H, Behanna HA, Martin Watterson D. Glia proinflammatory cytokine upregulation as a therapeutic target for neurodegenerative diseases: function-based and target-based discovery approaches. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 82:277-96.
203. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med.* 1998; 104(3A):2S-8S; discussion 21S-22S.

204. Vegeto E, Belcredito S, Ghisletti S, Meda C, Eterri S, Maggi A. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology*. 2006; 147:2263-72.
205. Viselli SM, Olsen NJ, Shults K, Steizer G, Kovacs WJ. Immunochemical and flow cytometric analysis of androgen receptor expression in thymocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 1995; 109:19-26.
206. Wade CB, Robinson S, Shapiro RA, Dorsa DM. Estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*. 2001; 142:2336-42.
207. Wagner EJ, Ronnekleiv OK, Bosch MA, Kelly MJ. Estrogen biphasically modifies hypothalamic GABAergic function concomitantly with negative and positive control of luteinizing hormone release. *J Neurosci*. 2001; 21: 2085-2093.
208. Walter P, Green S, Greene G, Krust SA, Bornert JM, Jeltsch JM, Straub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1985; 82:7889-93.
209. Wang RA, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Kumar R. P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-alpha and promotes hyperplasia in mammary epithelium. *EMBO J*. 2002; 21:5437-47.
210. Wang SW, Teng CS. Induction of feline acquired immune deficiency syndrome by feline leukemia virus: immuno- and neuroendocrine dysfunctions. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1994; 205:332-9.
211. Wang X, Zhu C, Qiu L, Hagberg H, Sandberg M, Blomgren K. Activation of ERK1/2 after neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J Neurochem*. 2003; 86:351-62.
212. Wang ZQ, Chen XC, Yang GY, Zhou LF. U0126 prevents ERK pathway phosphorylation and interleukin-1beta mRNA production after cerebral ischemia. *Chin Med Sci J*. 2004; 19:270-5.
213. Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Cytokine-to-brain communication: a review and analysis of alternative mechanisms. *Life Sci*. 1995; 57:1011-26.
214. Watson K, Fan GH. Macrophage inflammatory protein 2 inhibits beta-amyloid peptide (1-42)-mediated hippocampal neuronal apoptosis through activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol*. 2005; 67:757-65.
215. Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology*. 1997; 138:4030-3.

216. Watters JJ, Chun TY, Kim YN, Bertics PJ, Gorski J. Estrogen modulation of prolactin gene expression requires an intact mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in cultured rat pituitary cells. *Mol Endocrinol.* 2000; 14:1872-81.
217. Webster B, Hansen L, Adame A, Crews L, Torrance M, Thal L, Masliah E. Astroglial activation of extracellular-regulated kinase in early stages of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006; 65:142-51.
218. Weller RO, Engelhardt B, Phillips MJ Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. *Brain Pathol.* 1996; 6:275-88.
219. West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME. Calcium regulation of neuronal gene expression. 2001; 98:11024-31.
220. Wiegand SJ, Terasawa E, Bridson WE, Goy RW. Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. *Neuroendocrinology.* 1980; 31:147-57.
221. Wiegand, Terasawa E. Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology.* 1982; 34:395-404.
222. Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Gröne HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Pérez CA, Schütz G, Herbison AE. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron.* 2006; 52:271-80.
223. Wong M, Thompson TL, Moss RL. Nongenomic actions of estrogen in the brain: physiological significance and cellular mechanisms. *Crit Rev Neurobiol.* 1996; 10:189-203.
224. Wrona D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol.* 2006; 172:38-58.
225. Wu HH, Hsieh WS, Yang YY, Tsai MC. Lipoteichoic acid induces prostaglandin E(2) release and cyclooxygenase-2 synthesis in rat cortical neuronal cells: involvement of PKCepsilon and ERK activation. *Life Sci.* 2006; 79:272-80.
226. Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science.* 1996; 273:959-63.
227. Yoon H, Enquist LW, Dulac C. Olfactory inputs to hypothalamic neurons controlling reproduction and fertility. *Cell.* 2005; 123:669-682.

- 228. Zhang C, Bosch MA, Levine JE, Rønnekleiv OK, Kelly MJ. Gonadotropin-releasing hormone neurons express K(ATP) channels that are regulated by estrogen and responsive to glucose and metabolic inhibition. *J Neurosci.* 2007; 27:10153-64.
- 229. Zhang JQ, Cai WQ, Zhou de S, Su BY. Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats. *Brain Res.* 2002; 935:73-80.
- 230. Zhang W, Stanimirovic D. Current and future therapeutic strategies to target inflammation in stroke. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002; 1:151-66.
- 231. Zhang Y and Dong C. MAP kinases in immune responses. *Cell and Mol Immunol.* 2005; 2:20-27
- 232. Zhang Y, Dong C. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:2771-89.
- 233. Zhou Y, Watters JJ, Dorsa DM. Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology.* 1996; 137:2163-2166.
- 234. Zimring JC, Kapp LM, Yamada M, Wess J, Kapp JA. Regulation of CD8+ cytolytic T lymphocyte differentiation by a cholinergic pathway. *J Neuroimmunol.* 2005; 164:66-75.